

Die Rolle des Transmembransegments bei der Dimerisierung des PDGF-Rezeptors β

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich
vorgelegte

DISSERTATION

von

Diplom-Chemikerin Silke Hoffmann

aus

Bretten

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse

Referent: Prof. Dr. Anne S. Ulrich

Korreferent: Prof. Dr. Burkhard Luy

Tag der mündlichen Prüfung: 08.02.2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2007 bis Dezember 2010 am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl Biochemie unter der Leitung von Prof. Dr. Anne S. Ulrich angefertigt.

Erklärung

Hiermit erkläre ich wahrheitsgemäß, diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die bereits angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet zu haben.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher noch nicht als Prüfungsschrift eingereicht, weder an dieser noch an einer anderen Hochschule.

Karlsruhe, den 10.01.2011

Danksagung

Mein besonderer Dank möchte ich Frau Prof. Dr. Anne S. Ulrich aussprechen, für die interessante Aufgabenstellung, ihre fortwährende Unterstützung und ihr Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herzlich danken möchte ich Frau Dr. Claudia Muhle-Goll für die herausragende Betreuung, ihr immer offenes Ohr für mich und ihre vielen Ratschläge.

Herrn Dr. Dirk Windisch und Frau Stefanie Vollmer danke ich sehr für die gute Zusammenarbeit im E5-PDGFR-Projekt.

Dem CD-Team, Herrn Dr. Jochen Bürck und Herrn Siegmund Roth, danke ich für ihre Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der vielen Messungen und den vielen Anregungen.

Für die Unterstützung bei allen Fragen rund um die HPLC, der Durchführung der MALDI-Messungen und für die ständige Diskussionsbereitschaft, möchte ich mich bei Herrn Dr. Sergii Afonin bedanken.

Dr. Stephan Grage spreche ich meinen Dank für die Hilfestellung bei den Festkörper-NMR-Messungen aus.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises Ulrich sehr für die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Meiner Familie danke ich ganz herzlich für ihre vielseitige und ausdauernde Unterstützung und ihr Verständnis während der gesamten Studien- und Doktorandenzeit.

Abkürzungsverzeichnis

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
6-O-PC	1,2-di-O-Hexyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-triphosphat
a.u.	arbitrary units
bidest.	bidestilliert
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Circular Dichroism (Zirkulardichroismus)
CSF	Colony stimulating factor (Kolonienstimulierender Faktor)
Da	Dalton
DEPC	1,2-Dieicosenoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
dest.	destilliert
DHPC	1,2-Dihexanoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
DLPC	1,2-Dilauroyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
DMPG	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-[Phospho- <i>rac</i> - (1-glycerol)] (Natrium-Salz)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxy Ribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DPC	Dodecylphosphocholin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	Epidermal growth factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
Eph-R	Ephrin-Rezeptor
FGF	Fibroblast growth factor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
g	Gramm
h	Stunde(n)

His-Tag	Histidin-Anhang
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Ig	Immunoglobulin-ähnlich
INEPT	Insensitive Nuclei Enhancement by Polarisation Transfer
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LPPC	1-Palmitoyl-2-Hydroxy- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
M	molar
mA	Milliamper
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MAPK	mitogen-aktivierende Proteinkinase
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	millimolar
MRE	Mean Residual Ellipticity (mittlere Elliptizität pro Aminosäurerest)
MWCO	Molecular Weight Cut Off
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernspinmagnetresonanz)
NMRSD	normalized mean root squared deviation (normierte mittlere Standardabweichung)
NOESY	Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy
OCD	Oriented Circular Dichroism (Orientierter Zirkulardichroismus)
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDGF	Platelet-derived growth factor (Blutplättchen-Wachstumsfaktor)
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor (Blutplättchen-Wachstumsfaktor-Rezeptor)
pH	pondus/potentia Hydrogenii (pH-Wert)
PISEMA	Polarization Inversion Spin Exchange at Magic Angle

P/L	Protein-zu-Lipid-Verhältnis
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
ppm	parts per million (Teile von einer Million)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SH2	Src Homologie 2
TEMED	Tetramethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TMD	Transmembrandomäne
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TOF	Time of Flight
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	Transformation Storage Solution
U	Unit
UV	Ultraviolett
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Biologischer Hintergrund	1
1.1.1 Rezeptor-Tyrosinkinasen	1
1.1.2 Der Platelet-derived Growth Factor Rezeptor	5
1.1.3 Die Interaktion des PDGF-Rezeptor β mit dem E5-Onkoprotein	8
1.2 Strukturaufklärung von Membranproteinen	10
1.2.1 Packungsprinzipien von Membranproteinen	12
2. Aufgabenstellung	16
3. Theoretische Grundlagen	17
3.1 Membranmodelle	17
3.2 Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie	19
3.3 Orientierte CD-Spektroskopie	22
3.4 Kernspinnmagnetresonanz (NMR)-Spektroskopie	24
3.4.1 Heteronukleare mehrdimensionale NMR-Experimente zur Zuordnung der chemischen Verschiebungen und Strukturaufklärung	25
3.4.2 Strukturbestimmung von symmetrischen Dimeren	32
4. Material und Methoden	35
4.1 Materialien	35
4.1.1 Geräte	35
4.1.2 Verbrauchsmaterialien	38
4.1.3 Chemikalien	39
4.1.4 Marker	41
4.1.5 Kits für die Molekularbiologie	41
4.1.6 Vektoren	42
4.1.7 Bakterienstämme	42
4.1.8 Enzyme	42
4.1.9 Antikörper	42
4.1.10 Kulturmedien, Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie	43
4.2 Mikrobiologische Arbeitsmethoden	48
4.2.1 Arbeiten unter sterilen Bedingungen	48
4.2.2 Herstellung von Agar-Platten	48
4.2.3 Ausstrich aus einer Glycerinkultur	49
4.2.4 Herstellung einer Glycerinkultur	49
4.2.5 Anfertigung einer Übernachtskultur	49

4.3 Molekularbiologische Arbeitsmethoden	49
4.3.1 Plasmid-DNA Isolierung	49
4.3.2 Ethanolfällung der Plasmid-DNA	50
4.3.3 Plasmid-DNA-Sequenzierung	50
4.3.4 Verdau der DNA mit Restriktionsenzymen	50
4.3.5 Agarose-Gelelektrophorese	50
4.3.6 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen	51
4.3.7 Ligation	51
4.3.8 Herstellung hitzekompetenter Zellen	52
4.3.9 Hitzetransformation	52
4.4 Proteinchemische Methoden	52
4.4.1 Expression in Voll- und Minimalmedium	52
4.4.2 Zellaufschluss und Isolierung der Inclusion Bodies	53
4.4.3 Proteolytische Spaltung mit Hydroxylamin	53
4.4.4 Aufreinigung mittels Umkehr-Phase HPLC	54
4.4.5 Dialyse	54
4.5 Analytik	55
4.5.1 Konzentrationsbestimmung von DNA	55
4.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
4.5.3 Western-Blot	56
4.5.4 MALDI-TOF Massenspektrometrie	57
4.5.5 CD-Spektroskopie	57
4.5.6 OCD-Spektroskopie	59
4.5.7 Flüssigkeits-NMR Spektroskopie	59
4.5.8 Festkörper-NMR Spektroskopie	61
5. Ergebnisse	63
5.1 Herstellung von PDGFRβ-TM	63
5.1.1 Klonierung des PDGFR β -TM Gens in den Expressionsvektor pMMHb	63
5.1.2 Expression und Aufreinigung von PDGFR β -TM	65
5.1.3 Charakterisierung mittels SDS-PAGE und MALDI-TOF	68
5.2 Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie	70
5.2.1 CD an PDGFR β -TM in Detergenz-Mizellen und Lipid-Vesikeln	70
5.2.2 Orientierte CD an PDGFR β -TM in Lipiddoppelschichten	74
5.3 Flüssigkeits-NMR Spektroskopie	78
5.3.1 ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektroskopie	78
5.3.2 Zuordnung des Proteinrückgrats von PDGFR β -TM mittels 3D ^{15}N -editierter NOESY- und TOCSY-Experimente	80
5.3.3 Zuordnung der ^{13}C -Resonanzen von PDGFR β -TM mittels 3D Tripelresonanzexperimente	82
5.3.4 Auswertung des 3D ^{13}C -editierten NOESY-Spektrums von PDGFR β -TM zur Gewinnung von Abstandsinformationen	91
5.3.5 Berechnung der 3D-Struktur der PDGFR β -TM Helix	93
5.3.6 Strukturbestimmung des PDGFR β -TM Dimers	95

5.4 Festkörper-NMR Spektroskopie	101
5.4.1 Optimierung der Probenherstellung zur Untersuchung von PDGFR β -TM in orientierten Modellmembranen	101
5.4.2 Strukturanalyse von PDGFR β -TM in orientierten Membranen	105
6. Diskussion	109
7. Ausblick	117
8. Zusammenfassung	119
9. Literaturverzeichnis	121
10. Anhang	130
Publikationen	132
Lebenslauf	134

1. Einleitung

Eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie Zellwachstum, Differenzierung, Migration oder Apoptose werden durch Signale gesteuert, welche die Zelle von ihrer Umgebung erhält. Die Signale können hierbei von ganz unterschiedlicher Natur sein und reichen von einzelnen Photonen oder Ionen bis hin zu komplexen Hormonen. Zur Verarbeitung der verschiedenen Signale besitzen die Zellen ein großes Repertoire an integralen Membranrezeptoren. Solche Rezeptoren übertragen die extrazellulären Signale in den intrazellulären Raum, wo diese dann eine bestimmte Reaktion der Zelle auslösen.

Eine weit verbreitete Klasse von Zelloberflächenrezeptoren stellt die Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) dar, welche über ein Transmembransegment in der Plasmamembran verankert sind. Der genaue Mechanismus der Signalweiterleitung durch die Membran in das Zellinnere ist völlig unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte exemplarisch die Struktur des Transmembransegments des Tyrosinkinase-Rezeptors PDGFR β sowie sein Verhalten in Modellmembranen charakterisiert werden. Die hochaufgelöste Struktur kann allgemeine Einblicke in die molekularen Prinzipien der Rezeptoraktivierung und wichtige Informationen über Helix-Helix Wechselwirkungen von Membranproteinen liefern.

1.1 Biologischer Hintergrund

1.1.1 Rezeptor-Tyrosinkinasen

Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) kommen in allen eukaryotischen Organismen vor, wobei im menschlichen Genom 58 verschiedene RTKs bekannt sind [1]. Diese sind unter anderem bei der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse wie beispielsweise Zellstoffwechsel, Zellwachstum und Differenzierung, aber auch bei der Regeneration von Gewebe sowie an der Embryonalentwicklung, beteiligt [2]. Außerdem spielen RTKs bei Erkrankungen wie diabetischer Retinopathie, Atherosklerose und der Entstehung von Tumoren eine wichtige Rolle [3].

Im Allgemeinen sind RTKs aus einer N-terminalen extrazellulären Domäne, welche die Bindungsstelle für den Liganden trägt, einem einzigen membrandurchspannenden Segment, sowie einer cytosolischen Proteinkinasedomäne aufgebaut. Aufgrund struktureller Besonderheiten werden die

Rezeptoren in verschiedene Gruppen eingeteilt, wobei in Abbildung 1.1 die fünf bekanntesten Familien aufgezeigt sind. Die größten strukturellen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen sind innerhalb der extrazellulären Domäne zu finden. Die Gruppe der epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-Rezeptoren weisen in dieser Region zwei Cystein-reiche und Leucin-reiche Sequenzen auf, wohingegen Mitglieder der Blutplättchen-Wachstumsfaktor (PDGF)- und Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF)-Rezeptorfamilie fünf bzw. drei Immunoglobulin (Ig)-ähnliche Domänen besitzen.

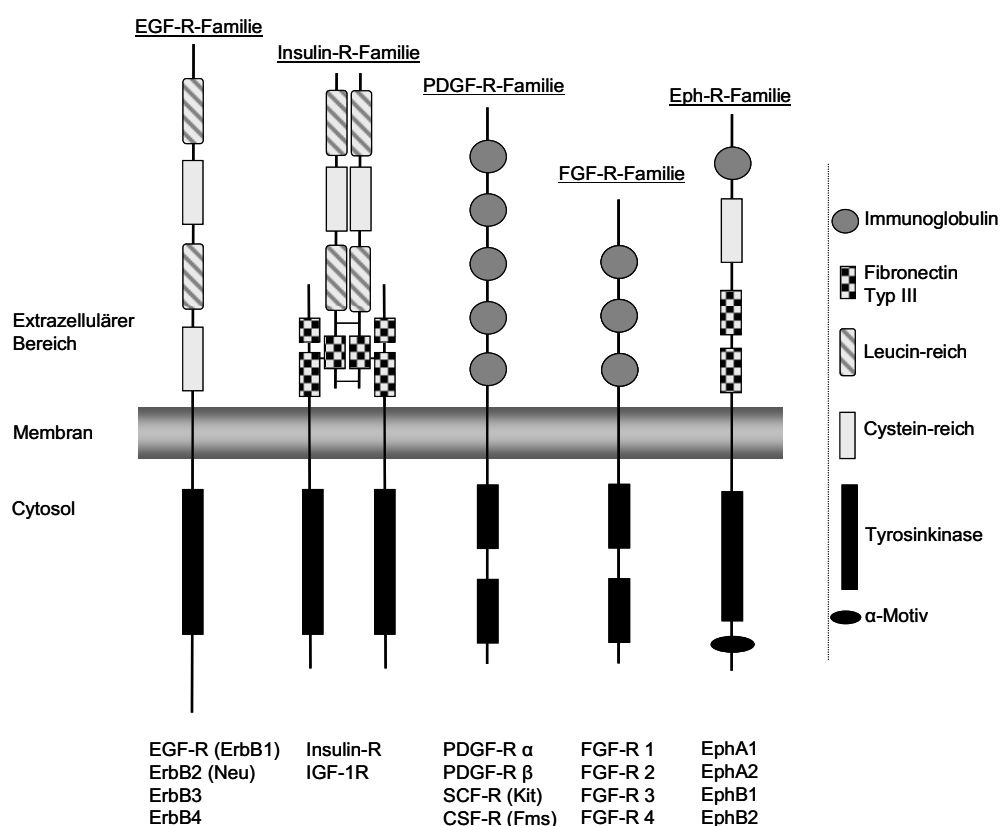


Abbildung 1.1: Überblick über die verschiedenen Familien der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Die Mitglieder der einzelnen Familien weisen untereinander einen einheitlichen Aufbau der Domänen auf. Abkürzungen: EGF-R: epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor, IGF-R: Insulinähnlicher-Rezeptor, PDGF-R: Blutplättchen-Wachstumsfaktor-Rezeptor, CSF-R: Kolonienstimulierender-Rezeptor, SCF-R: Stammzellenfaktor-Rezeptor, Eph-R: Ephrin-Rezeptor, FGF-R: Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor. Abbildung angelehnt an [3].

Die Rezeptoren der Ephrin (Eph)-Rezeptorfamilie besitzen neben einer Ig-ähnlichen und Cystein-reichen Domäne zudem zwei Fibronectin-ähnliche Sequenzen. Im Vergleich zu den anderen Familien liegen die Rezeptoren der Insulin-Rezeptorfamilie als Heterotetramere vor. Hierbei sind zwei α-Untereinheiten auf der extrazellulären

Seite über Disulfidbrücken mit zwei membrandurchspannenden β -Untereinheiten verknüpft, wobei die α -Untereinheiten die Bindestelle für den Liganden tragen [4,5]. Zudem besitzt die extrazelluläre Domäne der Insulin-Rezeptoren Leucin-reiche, Cystein-reiche sowie Fibronectin-ähnliche Sequenzen. Darüber hinaus weist die cytoplasmatische Domäne der verschiedenen RTK-Unterfamilien einen eher einheitlichen Aufbau auf. An die Transmembrandomäne, bestehend aus 22 bis 26 Aminosäuren, grenzt direkt nach einer kurzen Juxtamembransequenz die konservierte Tyrosinkinasedomäne an. Bei Rezeptoren der PDGF- und FGF-Unterfamilie ist die katalytische Tyrosinkinasedomäne durch eine Insertionssequenz von ca. 100 Aminosäuren unterbrochen, wobei deren genaue Funktion noch nicht verstanden ist [6].

Der vollständige Mechanismus der Aktivierung der RTK ist bis heute noch nicht aufgeklärt. Es wird angenommen, dass die Ligandenbindung an die extrazelluläre Domäne zur Dimerisierung zweier Rezeptormoleküle führt. Dadurch kommt es zur Aktivierung der Tyrosinkinase, wodurch verschiedene Signalkaskaden aktiviert werden (Abbildung 1.2).

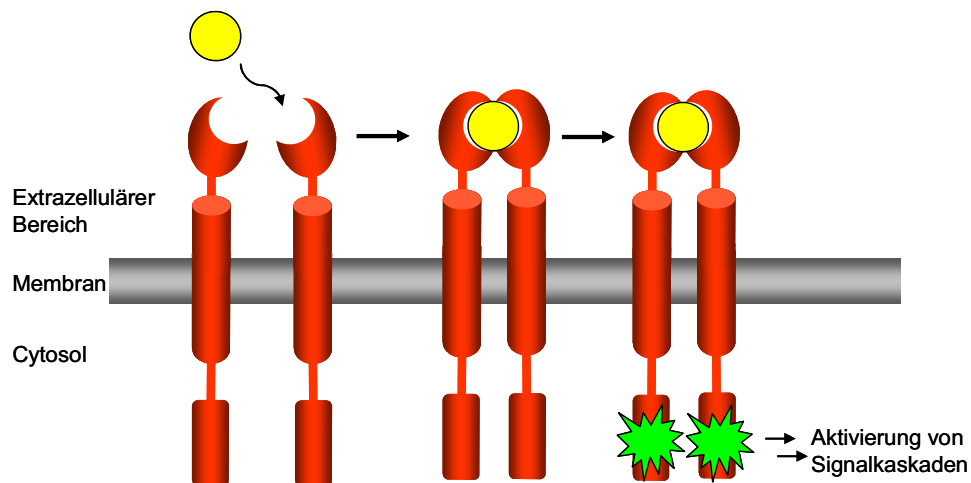


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen. Durch Bindung des Liganden an die extrazelluläre Domäne kommt es zur Dimerisierung zweier Rezeptormoleküle, wodurch es zur Rezeptoraktivierung und somit zur Einschaltung verschiedener Signalkaskaden kommt.

Für einige RTKs konnte allerdings gezeigt werden, dass sie trotz der Abwesenheit des Liganden in einem Gleichgewicht, bestehend aus monomeren und dimeren Rezeptoren, vorliegen [7-11]. Die Bindung des Liganden an die extrazelluläre Domäne verschiebt also das Gleichgewicht auf die Seite des Rezeptordimers und

trägt somit zur weiteren Stabilisierung des nicht-kovalenten Dimers bei. Bei homodimeren Liganden, wie beispielsweise dem PDGF-Hormon, erfolgt die Bindung eines dimeren Ligandenmoleküls über dessen identische Bindungsstellen an zwei Rezeptormolekülen [12]. Im Vergleich dazu sind im dimerisierten EGF-Rezeptor zwei monomere EGF-Liganden an jeweils ein EGF-Rezeptormolekül gebunden [13]. Der ebenfalls monomere Fibroblasten-Wachstumsfaktor FGF kann jedoch nur in Anwesenheit des Glykosaminoglykans Heparansulfat einen stabilen Komplex, bestehend aus einem FGF-Molekül und zwei FGF-Rezeptormolekülen, ausbilden [14]. Die Liganden der Eph-Rezeptoren sind im Vergleich zu den löslichen Liganden der anderen RTK-Familien mit der Plasmamembran einer gegenüberliegenden Zelle, entweder über eine Transmembrandomäne oder einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker, verknüpft [15,16]. Daher ist für die Ligandenbindung an den Rezeptor ein direkter Kontakt zwischen zwei Zellen erforderlich, wobei die N-terminale Ligandenbindungsdomäne zweier Eph-Rezeptormoleküle zwei Eph-Liganden einer benachbarten Zelle binden. Weiterhin können sich die dimerisierten Eph-Rezeptoren zu höheren Oligomeren zusammenlagern [17,18].

Es wird angenommen, dass die Ligandenbindung nicht nur eine Dimerisierung sondern auch eine konformelle Änderung der extrazellulären Rezeptordomäne bewirkt, was zur Verdrillung des gesamten Rezeptordimers führt [9]. Somit ändert sich die Struktur der dimerisierten Transmembrandomänen sowie des Dimer-Interfaces, wobei sich ein für den aktivierten Rezeptor charakteristisches Dimerisierungsmotiv ausbildet, was zu einer korrekten Ausrichtung der Tyrosinkinasedomäne führt [19]. Somit kommt es zur gegenseitigen trans-Autophosphorylierung von Tyrosin-Resten innerhalb der cytosolischen Domäne, an welche sich verschiedene Signaltransduktionsmoleküle über ihre SH2 (Src Homologie 2)- oder PTB (Phosphotyrosin)-Bindestellen reversibel anlagern. Hierdurch wird das extrazellulär eingehende Signal über diverse Signalkaskaden in den Zellkern weitergeleitet, was zur Expression verschiedener Gene und damit zur Änderung der physiologischen Aktivität der Zelle führt [2,20].

Wird die Rezeptoraktivität durch Mutationen oder andere genetische Veränderungen manipuliert, kann es zu Störungen bezüglich der Regulation der Enzymaktivität der Tyrosinkinase kommen, was zur bösartigen Transformation der Zelle und somit zur Entstehung von Krebs führen kann. Mehr als die Hälfte der RTKs des Menschen wurden in mutierter oder überexprimierter Form in bösartigen Tumoren gefunden

(eine Übersicht ist in [21] gegeben). Beispielsweise zeigen Krebsgeschwüre der Lunge und der Brust eine verstärkte Aktivität des EGF- und ErbB2-Rezeptors auf [21,22].

1.1.2 Der Platelet-derived Growth Factor Rezeptor

Es existieren zwei Isoformen des PDGF-Rezeptors, der PDGF-Rezeptor α und PDGF-Rezeptor β , welche jeweils ein Molekulargewicht von ca. 180 kDa besitzen. Die PDGF-Rezeptoren werden durch den mitogenen Wachstumsfaktor PDGF aktiviert. Dieser wurde vor über 30 Jahren erstmals in menschlichen Blutplättchen entdeckt [23]. PDGF spielt eine ausschlaggebende Rolle in vielen physiologisch wichtigen Prozessen wie beispielsweise der Zellproliferation und -migration, Aufbau des Cytoskeletts, Wundheilung sowie in der Embryonalentwicklung [24]. Mittlerweile sind vier verschiedene Isoformen bekannt, PDGF-A [25], -B [26], -C [27], und -D [28,29], die selbst als Dimer vorkommen. Hierbei sind zwei Polypeptidketten, welche aus vier verdrehten β -Faltblättern aufgebaut sind, über zwei Disulfidbrücken antiparallel zueinander ausgerichtet [30]. Neben den homodimeren (PDGF-AA, -BB, -CC, -DD) ist auch ein heterodimeres PDGF-Molekül, bestehend aus einer A- und B-Kette (PDGF-AB), bekannt. Die beiden PDGF-Rezeptoren weisen eine unterschiedliche Affinität in Bezug auf ihre Liganden auf. Während *in vivo* ausschließlich Rezeptor-Ligand-Komplexe, bestehend aus PDGF-AA oder -CC und dem PDGF-Rezeptor α beziehungsweise aus PDGF-BB und dem PDGF-Rezeptor β , volle Funktionsfähigkeit zeigten, konnten *in vitro* weitere Kombinationen nachgewiesen werden, einschließlich heterodimerer Rezeptorkomplexe bestehend aus einem PDGF-Rezeptor α und β [31].

Die Bindung von PDGF erfolgt über die zweite und dritte Ig-ähnliche Domäne der extrazellulären Domäne des Rezeptors, wobei die Bindung hauptsächlich von hydrophoben Wechselwirkungen stabilisiert wird [12]. Die erste Ig-ähnliche Domäne ist nicht an der Ligandenbindung beteiligt und ist, analog zu den anderen Rezeptoren der PDGF-Rezeptorfamilie, nach außen stark abgewinkelt [32,33]. Weiterhin kommt es zur Ausbildung von homotypischen Wechselwirkungen zwischen den vierten Ig-ähnlichen Domänen zweier Rezeptormoleküle. Mutationsstudien haben ergeben, dass bestimmte Aminosäuren innerhalb dieser Region ausschlaggebend für eine vollständige Aktivierung sind. Vermutlich kommt es zur Ausbildung von Salzbrücken zwischen zwei Rezeptormolekülen, welche für die Aktivierung des Rezeptors wichtig

sind, aber keinen Einfluss auf die Dimerisierungsfähigkeit haben [34]. Für den ligandengebundenen Stammzellenfaktor (SCF)-Rezeptor konnte gezeigt werden, dass diese homotypischen Wechselwirkungen eine korrekte Positionierung und Orientierung der an die Membran angrenzenden Regionen bewirken, um eine Interaktion zwischen den Tyrosinkinasedomänen im Cytosol zu ermöglichen [35].

Unmittelbar nach der Aktivierung durch PDGF kommt es auf der cytosolischen Seite des PDGF-Rezeptors zur Autophosphorylierung verschiedener Tyrosinreste. Die Autophosphorylierung eines konservierten Tyrosinrests (Tyr-857 im PDGF-Rezeptor β [36]) innerhalb der Kinasedomäne führt zu einer Steigerung ihrer Enzymaktivität, während die anderen phosphorylierten Tyrosine als Bindestellen für viele Signaltransduktionsmoleküle dienen. Diese besitzen entweder selbst enzymatische Aktivität oder stellen Adapterproteine dar, die mit anderen Enzymen interagieren. Sie binden über ihre SH2- oder PTB-Domänen an phosphorylierte Tyrosinreste, über SH3-Domänen an Prolin-reiche Sequenzen oder über Pleckstrin Homologie (PH)-Sequenzen an Phospholipide der Membran. Jedes Signalmolekül generiert nach der Aktivierung ein spezifisches Signal, welches zu einer gezielten Antwort der Zelle führt. In Abbildung 1.3 sind verschiedene Signalkaskaden gezeigt, die nach der Aktivierung des PDGF-Rezeptors aktiviert werden können.

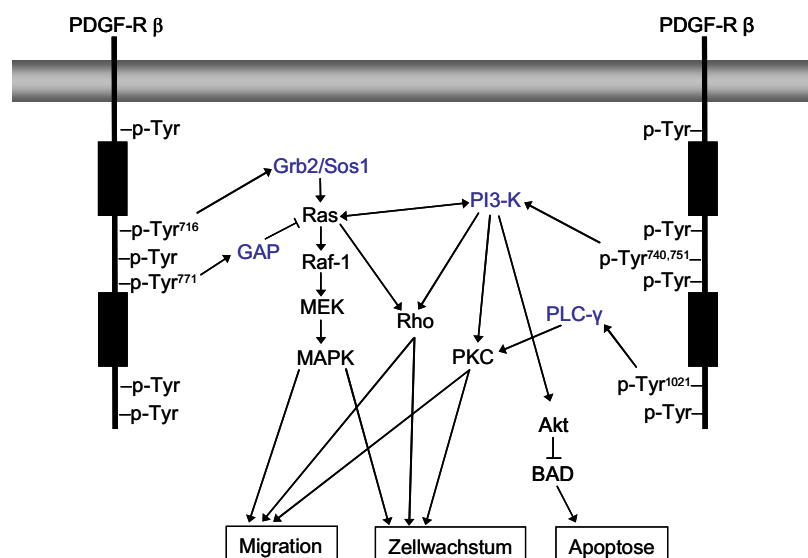


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung ausgewählter Signaltransduktionswege des aktivierten PDGF-Rezeptors β . Nach der Aktivierung werden spezifische Tyrosin-Reste der cytosolischen Domäne phosphoryliert, an welche Signaltransduktionsmoleküle binden und weitere Signalmoleküle aktivieren, was zu Zellwachstum, -migration und Hemmung der Apoptose führt. Die Abbildung zeigt nur die cytosolische Rezeptordomäne, wobei der graue Balken die Plasmamembran darstellt. Abbildung verändert nach [37].

Beispielsweise bindet das heterodimere Enzym Phosphatidylinositol-3 (PI3)-Kinase, welches aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit zusammengesetzt ist, über eine seiner SH2-Domänen der regulatorischen Untereinheit an das phosphorylierte Tyrosin 740 und 751 des aktivierten PDGF-Rezeptors β . Die katalytische Untereinheit der PI3-Kinase wird aktiviert und vermittelt die Phosphorylierung des Substrats Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP_3). Dies führt zur Translokation von verschiedenen Signalproteinen wie der Serin/Threoninkinase Akt an die Membran, welche dann über ihre PH-Domäne an PIP_3 bindet und aktiviert wird. Weiterhin kann die Aktivierung der PI3-Kinase auch Signalkaskaden einleiten, an welchen die GTP-bindenden Proteine der Rho-Familie sowie die Proteinkinase C beteiligt sind.

Ein anderes Enzym, welches das gleiche Substrat wie die PI3-Kinase besitzt, ist die Phospholipase C (PLC)- γ . Diese wird durch die Bindung ihrer SH2-Domäne an einen phosphorylierten Tyrosin-Rest aktiviert und katalysiert die Hydrolyse von PIP_2 zu Diacylglycerol (DAG) und IP_3 , welche beide als sekundäre Botenstoffe fungieren. Die erhöhte Konzentration von IP_3 führt nun zum Einstrom von Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern, die an Calmodulin gebunden, verschiedene Proteinkinasen aktivieren. DAG wiederum aktiviert die Proteinkinase C, was zur Aktivierung diverser Transkriptionsfaktoren im Zellkern und zur anschließenden Expression bestimmter Zielgene führt, welche z.B. die Zellmigration regulieren.

An einer weiteren bedeutenden Signalkaskade ist die mitogen-aktivierende Proteinkinase (MAPK) beteiligt. Das Adapterprotein Grb2 bildet hierbei über seine SH3-Domäne mit dem Nukleotidaustauschfaktor Sos einen Komplex. Dieser wird nach der Bindung an einen spezifischen phosphorylierten Tyrosin-Rest des Rezeptors aktiviert, wobei Sos an die Plasmamembran transloziert wird, wo es Ras-GDP in Ras-GTP umwandelt. Im weiteren Verlauf des MAP-Kinase Signalwegs werden verschiedene in Serie geschaltete Kinasen aktiviert, wobei es letztendlich zur Aktivierung der MAP-Kinase kommt. Diese phosphoryliert nach dem Transport in den Zellkern diverse Transkriptionsfaktoren, welche Zellwachstum und -migration regulieren.

Um eine korrekte Weiterleitung der Signale zu gewähren, muss die Aktivität des PDGF-Rezeptors streng reguliert werden. Dies erfolgt beispielsweise anhand eines negativen Rückkopplungsmechanismus, wobei unmittelbar nach der Aktivierung der MAP-Kinase durch Ras diese den Nukleotidaustauschfaktor Sos phosphoryliert,

welcher somit inaktiviert wird und zu einer verminderten Aktivität von Ras beiträgt. Außerdem wird die Stärke des weitergeleiteten Signals durch gleichzeitige Stimulation von aktivierenden und inhibierenden Signalen moduliert. Die Phosphorylierung der Tyrosinreste wird durch die Aktivierung von Tyrosin-Phosphatasen ausgeglichen. Weiterhin wirkt die Bindung des GTPase aktivierenden Proteins GAP an den Rezeptor der Aktivierung von Ras durch die Komplexbildung von Grb2/Sos entgegen. Letztendlich wird das Signal auch infolge des endozytotischen Abbaus sowie der Degradierung des Ligand-Rezeptor-Komplexes, welcher unmittelbar nach der Aktivierung des Rezeptors erfolgt, abgeschwächt.

Der PDGF-Rezeptor ist bei verschiedenen Krankheiten beteiligt. Bei Atherosklerose wurde eine erhöhte Konzentration sowohl des Rezeptors als auch des PDGF-Hormons in allen Zelltypen der betroffenen Arterienwand gefunden [38]. Bei fibrotischen Krankheiten der Lunge und Leber ist PDGF und sein Rezeptor für die gesteigerte Proliferation der Myofibroblasten und des exzessiven Aufbaus von extrazellulärer Matrix verantwortlich, was letztlich zur Vernarbung des Gewebes und Funktionsverlust des Organs führt [39]. Zudem kann der PDGF-Rezeptor auch von verschiedenen Onkogenen aktiviert werden, was bei der Entstehung und Entwicklung von Tumoren eine Rolle spielen kann. Das Simian Sarcoma Retrovirus (SSV) kodiert für ein Protein, welches dem PDGF-B Protein homolog ist und dieselbe Bindungsstelle für den Rezeptor aufweist. Die Bindung des Virusproteins an den PDGF-Rezeptor β führt zu dessen autokriner Aktivierung sowie zu einer konstitutiven Signaltransduktion. Weiterhin kann das E5-Onkoprotein aus dem Rinderpapillomavirus Typ I den PDGF-Rezeptor β aktivieren.

1.1.3 Die Interaktion des PDGF-Rezeptor β mit dem E5-Onkoprotein

Das Rinderpapillomavirus Typ I ist ein kleiner, unbehüllter und doppelsträngiger DNA-Virus, welcher bei Rindern die äußeren Epithelschichten infiziert, wodurch meist gutartige, warzenähnliche Wucherungen der Haut, sogenannte Fibropapillome, entstehen. Die Transformationsfähigkeit dieser Viren *in vivo* wie auch von Fibroblastenkulturen *in vitro* ist hierbei auf das E5-Protein zurückzuführen, welches aus 44 hauptsächlich hydrophoben Aminosäuren besteht [40]. E5 kommt in der infizierten Zelle zum größten Teil in den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums und Golgi-Apparats vor, sowie in geringem Maße auch in der

Plasmamembran [41]. Strukturuntersuchungen mittels Zirkulardichroismus (CD)- und Kernspinmagnetresonanz (NMR)-Spektroskopie ergaben eine α -helikale Sekundärstruktur für den die Membran einfach durchspannenden N-terminalen Transmembranbereich. Dieser wird auf beiden Seiten von unregelmäßigeren α -Helices flankiert, die aus der Lipiddoppelschicht herausragen. Der C-terminale Bereich, in dem sich zwei konservierte Cysteine befinden, besteht überwiegend aus hydrophilen Aminosäuren und nimmt höchstwahrscheinlich eine ungeordnete Struktur an (Abbildung 1.4) [42,43].

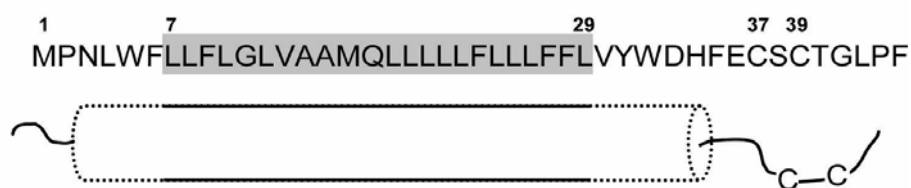


Abbildung 1.4: Strukturmodell des membraninsertierten E5-Proteins. Der graue Kasten zeigt die Aminosäuren, welche vermutlich die reguläre Transmembranhelix ausbilden (durchgezogene Linie) und die angrenzenden helikalen Bereiche (gepunktete Linie). Die beiden Cysteine befinden sich in dem unstrukturierten C-terminalen Bereich. Abbildung modifiziert übernommen aus [42].

E5 interagiert hauptsächlich mit dem PDGF-Rezeptor β , was zur konstitutiven Rezeptoraktivierung und schließlich zur viralen Transformation der infizierten Zelle führt [44-46]. Der Mechanismus der Rezeptoraktivierung unterscheidet sich hierbei jedoch grundlegend von dem des PDGF-Hormons. Das E5-Protein aktiviert den Rezeptor unabhängig vom natürlichen Liganden, wobei es mit der Transmembrandomäne sowie dem Juxtamembranbereich des Rezeptors interagiert [47-49]. Biologische Tests zeigten, dass für die Rezeptoraktivierung das Vorliegen von E5 in seiner homodimeren Form entscheidend ist, wobei sich die beiden E5-Untereinheiten hierfür in einer gewissen Konfiguration zueinander befinden müssen, so dass sich ein bestimmtes Dimer-Interface ausbilden kann [50]. Anhand von molekulardynamischen (MD) Simulationen wurde ein Strukturmodell des E5-Dimers erstellt, welches zeigt, dass zwei E5-Monomere eine parallele linksgängige Leucin-Zipper ähnliche Struktur ausbilden [51]. Diese wird durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten der Leucine, welche entlang des Dimer-Interfaces verteilt sind, stabilisiert. Die einzige polare Aminosäure in der Transmembranhelix, Glutamin 17, befindet sich ebenfalls innerhalb des Dimer-

Interfaces und bildet interhelikale Wasserstoffbrücken zu dem Glutamin der anderen Helix sowie zur Hauptkette von Alanin 14 aus.

Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass die beiden Cysteine im C-terminalen Bereich nicht ausschlaggebend für die Dimerisierung sind, da E5 unabhängig von den Cysteinen nicht-kovalente Dimere ausbilden kann [43,52]. Weiterhin weisen sowohl das monomere E5-Protein als auch verschiedene Cystein-Mutanten die gleiche Sekundärstruktur auf, was vermuten lässt, dass die Ausbildung der Disulfidbrücken zu keiner Umfaltung der Struktur oder Umorientierung in der Membran führt [52].

Für die Interaktion mit dem PDGF-Rezeptor β wird angenommen, dass E5 eine Art molekulares Gerüst für den Rezeptor darstellt, welches durch die Bindung zwei Rezeptormoleküle in räumliche Nähe zueinander bringt, was zur Aktivierung der Tyrosinkinase und somit zur Signaltransduktion führt (siehe Kapitel 1.1.2) [51]. Mutationsexperimente zeigten, dass bei der Aktivierung des PDGF-Rezeptor β die beiden Aminosäuren Glutamin 17 und Asparaginsäure 33 von E5 eine wichtige Rolle spielen, welche zu Lysin 499 und Threonin 513 des PDGF-Rezeptors β eine Salzbrücke bzw. Wasserstoffbrückenbindung ausbilden. [53,54]. Nach Austausch mit anderen Aminosäuren können entsprechende Mutanten keine Rezeptoraktivierung auslösen, weshalb beispielsweise der PDGF-Rezeptor α , der diese Aminosäuren nicht besitzt, von E5 nicht aktiviert werden kann [45,55,56].

1.2 Strukturaufklärung von Membranproteinen

Etwa ein Drittel aller im menschlichen Genom kodierenden Proteine sind Membranproteine [57]. Im komplexen Netzwerk der Zelle nehmen sie an vielen physiologisch wichtigen Prozessen teil. Als Rezeptoren der Plasmamembran, wie der im vorherigen Kapitel 1.1.2 beschriebene PDGF-Rezeptor, leiten sie Signale aus der Umgebung in das Zellinnere weiter. Weiterhin sind sie als Transport- und Kanalproteine für den Stofftransport in und aus der Zelle verantwortlich, während sie als Ankerproteine das Cytoskelett stabilisieren und die Kommunikation zwischen den Zellen vermitteln.

Um die genaue Funktionsweise verstehen zu können, ist die Kenntnis der dreidimensionalen Proteinstruktur unerlässlich, wobei nur 260 der ungefähr 69.000 bekannten Proteinstrukturen, welche in der *Protein Data Bank* (PDB, <http://www.rcsb.org>, Stand: 11/2010) erfasst sind, von Membranproteinen stammen.

Grund hierfür ist die äußerst schwierige Handhabung von Membranproteinen, welche wegen ihrer intrinsischen Hydrophobizität zur unspezifischen Aggregationsbildung neigen, sobald sie sich nicht mehr in einer natürlichen Membranumgebung befinden. Dieses Verhalten stellt besondere Anforderungen an die gebräuchlichen strukturb biologischen Methoden zur Bestimmung der atomar aufgelösten Struktur, wie die Röntgenkristallstrukturanalyse und die NMR-Spektroskopie. Für die Röntgenkristallographie ist es unerlässlich, einen ausreichend großen Kristall des zu untersuchenden Proteins zu erhalten, wobei dies bei Membranproteinen oftmals nicht möglich ist. Im Vergleich dazu wird das zu untersuchende Protein in der NMR-Spektroskopie unter physiologischeren Bedingungen untersucht. Für die Strukturaufklärung mittels Flüssigkeits-NMR wird das Protein in membranimitierende Umgebungen wie beispielsweise Detergenz-Mizellen eingebracht. Aufgrund der schnellen Reorientierung der Probenmoleküle kommt es zur isotropen Ausmittelung der chemischen Verschiebungen, was zu Signalen mit schmalen Linien führt. Für die Strukturaufklärung werden verschiedene mehrdimensionale Experimente, welche Informationen über die räumliche Beziehung der Protonen zueinander aufzeigen, ausgewertet, um letztendlich die dreidimensionale Raumstruktur zu bestimmen.

Die Festkörper-NMR hingegen bietet die Möglichkeit, die Struktur von Membranproteinen in einer „natürlichen“ Umgebung wie z.B. in Phospholipiddoppelschichten, zu bestimmen. Aufgrund der eingeschränkten Beweglichkeit der Moleküle in der (flüssigkristallinen) Membran kommt es zu einer Richtungsabhängigkeit der chemischen Verschiebungen, was sich in breiten Linienformen äußert. Anhand der anisotropen Wechselwirkungen können wichtige Informationen bezüglich der Struktur gewonnen werden. Beispielsweise liefert das zweidimensionale PISEMA (Polarization Inversion Spin Exchange at Magic Angle)-Experiment hochaufgelöste NMR-Spektren, und ermöglicht die Bestimmung der Helixlänge, Orientierung und Neigung eines Proteins bezüglich der Membran [58].

Eine weitere Möglichkeit, Membranproteine in Lipiddoppelschichten zu untersuchen, bietet die CD-Spektroskopie. Hierbei können die fraktionalen Sekundärstrukturanteile eines Membranproteins, welches in Phospholipid-Vesikeln rekonstituiert ist, bestimmt werden. Eine neuere Technik, die sogenannte Orientierte CD-Spektroskopie (OCD), erlaubt eine Abschätzung der Ausrichtung α -helikaler Bereiche eines Proteins, welches in makroskopisch ausgerichteten Lipiddoppelschichten rekonstituiert ist. Die beiden zuletzt genannten Techniken liefern zwar keine atomar aufgelösten

Strukturen, werden aber häufig ergänzend zu den hochauflösenden Methoden herangezogen.

1.2.1 Packungsprinzipien von Membranproteinen

Gemeinsames Strukturmerkmal aller Membranproteine ist eine oder mehrere, vorwiegend aus hydrophoben Aminosäuren bestehende Transmembrandomäne(n), über welche die Proteine stabil in die Membran eingelagert sind. Diese Domänen nehmen - soweit bisher bekannt - entweder eine α -helikale oder β -Fass-Struktur an. Die selteneren β -Fass-Strukturen kommen überwiegend in Porinen der äußeren Membranen Gram-negativer Bakterien, Chloroplasten und Mitochondrien vor, wohingegen diejenigen mit α -helikaler Struktur hauptsächlich in der Cytoplasmamembran vorzufinden sind. Im Rahmen dieser Arbeit soll auf den weit verbreiteten α -helikalen Typ eingegangen werden.

Um biologisch aktiv zu sein, bilden zahlreiche α -helikale Membranproteine homo- oder heterooligomere Komplexe aus. Die Triebkräfte, die für die Interaktion löslicher Domänen verantwortlich sind, können im unpolaren Milieu der Lipiddoppelschicht allerdings nicht wirksam werden. Daher tritt der hydrophobe Effekt, welcher den Entropiegewinn beim Abstreifen geordneter Hydrathüllen von miteinander wechselwirkenden Oberflächen beschreibt, bei der Assemblierung von Transmembran (TM)-Regionen nicht auf. Bei der Interaktion zwischen TM-Helices kommt es neben wenigen spezifischen elektrostatischen Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken vor allem zur Ausbildung von Van-der-Waals-Wechselwirkungen, was sich in einer höheren Packungsdichte im Vergleich zu löslichen Proteinen widerspiegelt [59]. Diese Wechselwirkungen tragen maßgeblich zur Stabilisierung bei, wodurch das Fehlen hydrophober Effekte kompensiert werden kann.

Weiterhin werden die Helix-Helix-Wechselwirkungen oftmals über spezifische Sequenzmotive innerhalb der TM-Helices vermittelt. Ein weit verbreitetes Strukturmotiv ist das GxxxG-(GG4 oder GX4) Motiv, in welchem zwei Glycine von drei beliebigen Aminosäuren getrennt sind [60]. In Glycophorin A (GpA) beispielsweise, einem kleinen Transmembranprotein der Erythrozytenmembran, dimerisieren die beiden interagierenden Helices über ein solches Motiv [61]. Hierbei ermöglichen die kleinen Glycine an Position i und $(i+4)$ innerhalb der Aminosäuresequenz $L^{75}IxxGVxxGVxxT^{87}$, dass die beiden Helices in engen Kontakt

miteinander kommen, wodurch sich innerhalb dieses Bereichs verstärkt Van-der-Waals-Wechselwirkungen ausbilden können (Abbildung 1.5) [62-64].

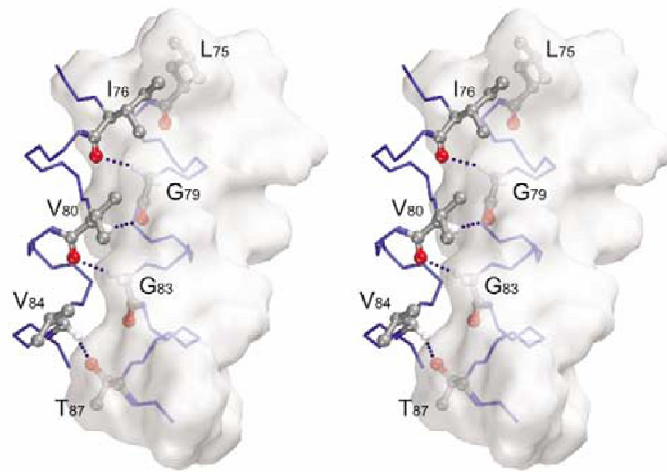


Abbildung 1.5: Struktur des Dimer-Interfaces von Glycophorin A. Dargestellt sind die über das GX4-Motiv interagierenden Seitenketten (LxxGVxxGVxxT), wobei die Oberflächendarstellung verdeutlicht, wie diese Reste im Dimer ineinander greifen. Stereoabbildung aus [64].

Weiterhin bilden die angrenzenden Aminosäuren zusätzliche Kontaktflächen aus, welche die Dimerstruktur stabilisieren. Die hochaufgelöste Struktur zeigt, dass die beiden Helices in einer rechts-gängigen Anordnung dimerisieren [64,65]. Außerdem wird die Interaktion durch die Ausbildung von interhelikalen Wasserstoffbrücken zwischen dem C α -Proton des Glycins und dem Carbonylsauerstoff benachbarter Helices stabilisiert [66]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die beiden Glycine des GX4-Motivs auch durch andere kleine Reste wie Alanin und Serin ausgetauscht werden können [67-69].

Neben GpA kommt das GX4-Motiv in einer Vielzahl von Membranproteinen vor. Die Transmembranhelix des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors weist zugleich mehrere GX4-ähnliche Motive auf, anhand derer die dimerisierten Rezeptoren vermutlich verschiedene Konformationen bei ihrer Aktivierung einnehmen können [9,70].

Darüber hinaus spielen polare Aminosäuren durch die Ausbildung interhelikaler Wasserstoffbrücken bei den Helix-Helix-Interaktionen eine wichtige Rolle. Mutationsstudien ergaben, dass die Insertion verschiedener polarer Aminosäuren wie Asparagin und Glutamin in eine sonst ausschließlich aus hydrophoben Aminosäuren bestehenden Transmembranhelix zu deren Homodimerisierung

führt [71,72]. Die Struktur des homodimeren BNIP3 (Bcl-2 Nineteen-kDa interacting protein 3)-Membranproteins zeigt ein ähnliches Packungsmuster wie das von GpA, wobei die beiden Aminosäuren Serin und Histidin, welche sich in der Mitte der Transmembranregion befinden, zusätzlich interhelikale Wasserstoffbrücken ausbilden [73]. Auch der Komplex des T-Zell-Rezeptors (TCR) wird von einer Reihe Salzbrücken zwischen ionisierbaren Resten in der Membran stabilisiert [74,75]. Wie bereits Kapitel 1.1.3 erwähnt, besitzt das E5-Onkoprotein innerhalb des Transmembranbereichs eine polare Aminosäure (Glutamin 17), für die postuliert wird, sowohl bei der Homodimerisierung von E5 als auch bei der Interaktion mit dem PDGF-Rezeptor β involviert zu sein.

Ein weiteres Strukturmotiv, welches erstmals für DNA-bindende, lösliche Proteine beschrieben wurde, ist das Leucin-Zipper-Motiv [76]. Hierbei folgen nahezu alle benachbarten Aminosäuren einem für Leucin-Zipper typischen Heptadenmuster aus sieben Aminosäuren „abcdefg“ (Abbildung 1.6). Die Seitenketten an den Positionen a, d, e und g mehrerer aufeinander folgender Heptaden bilden geometrisch komplementäre und damit interaktionsfähige Helixoberflächen aus, welche bei der Interaktion der Helices „reißverschlussartig“ ineinander greifen, was zur Ausbildung einer linksgängigen Superhelix (coiled-coil) führt. Die Aminosäuren der a- und d-Positionen bilden hierbei das Dimer-Interface und werden von Leucinen besetzt. Die Aminosäuren, welche die e- und f-Position einnehmen, sind häufig geladen und befinden sich am Rand des Interfaces, wo sie elektrostatische Wechselwirkungen zueinander sowie hydrophobe Kontakte zum Interface ausbilden können.

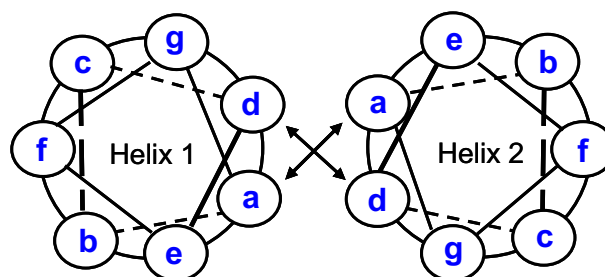


Abbildung 1.6: Helical Wheel-Diagramm zweier Helices, die über ein Heptadenmuster dimerisieren. Bei den Aminosäuren auf den „a-“ und „d-“ Positionen handelt es sich überwiegend um Leucine. Sie befinden sich im Innern des Dimer-Interfaces.

In verschiedenen Membranproteinen wurde ein solches Motiv gefunden. Bei der Dimerisierung der Transmembransegmente zweier EphA2-Rezeptoren interagieren die Helices über ein verlängertes Leucin-Zipper-ähnliches Heptadenmotiv, wobei sich

eine linksgängige Struktur ausbildet. Die für Leucin-Zipper typische „knobs-into-holes“ Packung wird dabei neben Leucinen auch von Glycin, Alanin und Valin ausgebildet [77].

Weiterhin wurde ein solches Strukturmotiv auch in helikalen Bündeln, welche aus oligomerisierten α -Helices bestehen, gefunden. Beispielsweise bildet Phospholamban einen oligomeren Komplex aus fünf Phospholamban-Molekülen, für dessen Ausbildung ein aus Isoleucinen und Leucinen bestehendes Leucin-Zipper-Motiv in den Transmembranhelices ausschlaggebend ist (Abbildung 1.7) [78]. Außerdem wurde ein solches Motiv auch in Membranproteinen gefunden, welche zugleich mehrere Transmembranhelices besitzen wie das Bakteriorhodopsin, dem Prototyp heptahelikaler Rezeptoren.

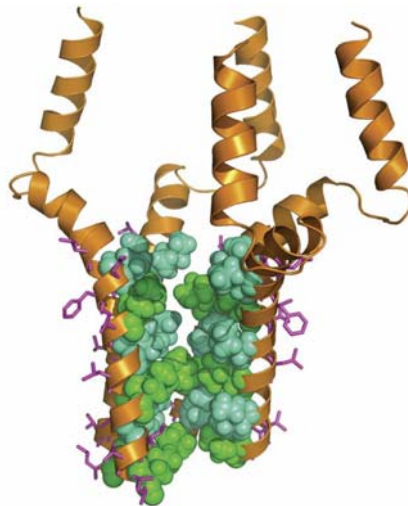


Abbildung 1.7: Struktur des pentameren Phospholambans. Die nicht-kovalente Oligomerisierung von fünf Phospholamban-Proteinen wird durch Leucin- und Isoleucinreste der Transmembrandomänen anhand eines Leucin-Zipper ähnlichen Strukturmotivs vermittelt. Die Leucin- und Isoleucinreste sind in grün und hellblau dargestellt. Abbildung übernommen aus [78].

2. Aufgabenstellung

Der Blutplättchen-Wachstumsfaktor-(PDGF)-Rezeptor β gehört zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen und spielt eine wichtige Rolle bei der Embryonalentwicklung und der Wundheilung. Durch Liganden-induzierte Dimerisierung zweier Rezeptormoleküle kommt es zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden. Eine besondere Bedeutung kommt hierbei dem Transmembransegment des Rezeptors zu, welcher das durch die Bindung des Liganden ausgelöste Signal durch die Membran in das Zellinnere weiterleitet. Die Helix-Helix Wechselwirkungen und der molekulare Mechanismus der Signalübertragung von „außen“ über die Membran hinweg nach „innen“ ist bisher nicht bekannt. Um diese offene Fragestellung zu untersuchen, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Struktur des Transmembransegments des PDGF-Rezeptors β (PDGFR β -TM) und sein Verhalten in Modellmembranen charakterisiert werden.

- Für NMR-spektroskopische Untersuchungen sollte PDGFR β -TM ^{15}N - bzw. $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -markiert hergestellt und sein Oligomerisierungsverhalten untersucht werden. Da sich Membranproteine oft nur in geringen Ausbeuten darstellen lassen, sollte zunächst ein Protokoll für die rekombinante Herstellung und Aufreinigung in Milligramm-Mengen etabliert werden.
- Die Sekundärstruktur von PDGFR β -TM sollte mit Hilfe von Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie in verschiedenen membranimitierenden Umgebungen qualitativ betrachtet und somit die Rekonstitution optimiert werden.
- Mittels Flüssigkeits-NMR sollte die dreidimensionale Struktur von PDGFR β -TM in Detergenz-Mizellen bestimmt werden.
- Der Einfluss der Lipidumgebung auf die Orientierung des Transmembransegments in der Membran hinsichtlich Neigungs- und Drehwinkel sollte anhand von orientiertem Zirkulardichroismus (OCD) und Festkörper-NMR untersucht werden.
- Ein langfristiges Ziel dieses Projekts ist es, die Interaktion von PDGFR β -TM mit dem viralen Onkoprotein E5 zu untersuchen. Die Struktur des Komplexes aus PDGFR β -TM und E5 könnten wichtige Informationen über den Mechanismus der ligandenunabhängigen Rezeptoraktivierung sowie allgemein über Helix-Helix-Wechselwirkungen in der Membran liefern.

3. Theoretische Grundlagen

3.1 Membranmodelle

Zur Strukturuntersuchung von unlöslichen, hydrophoben Membranproteinen müssen diese in eine Umgebung eingebracht werden, welche die natürliche Membrenumgebung imitiert. Hierfür eignen sich prinzipiell Mizellen, Vesikel, Bizellen und orientierte Phospholipiddoppelschichten (Abbildung 3.1). In Anwesenheit von Wasser lagern sich die Detergenz- oder Lipidmoleküle spontan zu diesen Strukturen zusammen. Hierbei sind die hydrophilen Kopfgruppen der Moleküle dem Wasser zugewandt, während die hydrophoben Reste einen hydrophoben Kern bilden.

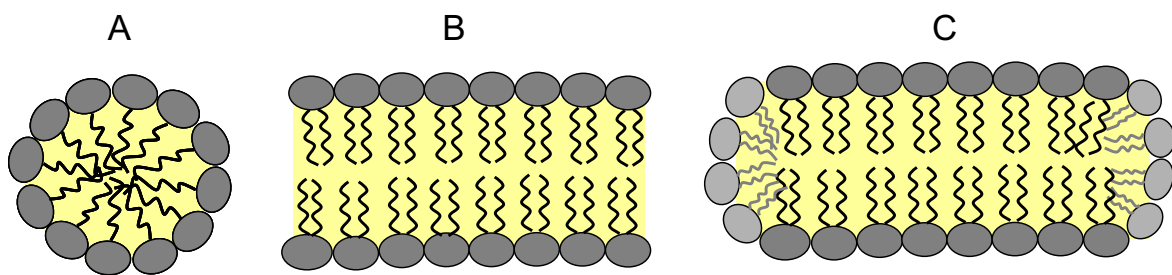


Abbildung 3.1: Membranimitierende Modellsysteme die zur Untersuchung von Membranproteinen genutzt werden. A: Detergenz-Mizelle, B: Phospholipiddoppelschicht, C: Bizelle.

Für CD- und Flüssigkeits-NMR-spektroskopische Untersuchungen werden häufig Mizellen aus dem negativ geladenen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) oder dem zwitterionischen Dodecylphosphocholin (DPC) verwendet. Für die OCD und Festkörper-NMR wird das zu untersuchende Membranprotein in uniaxial orientierten Phospholipiddoppelschichten (z.B. aus POPC, DMPC oder DEPC) auf Glasplättchen rekonstituiert. Weiterhin können für Festkörper-NMR-Messungen auch magnetisch orientierte Bizellen benutzt werden, welche zum Beispiel aus dem langkettigen Lipid DMPC und dem kurzkettigen Lipid DHPC bzw. 6-O-PC bestehen und sich zu scheibenförmigen Membranfragmenten zusammenlagern. Hierbei bildet das langkettige Lipid eine planare Lipiddoppelschicht aus, die von dem kurzkettigen Lipid an den Rändern abgeschlossen wird. Das molare Verhältnis von lang- und kurzkettigen Lipiden wird auch als q-Verhältnis bezeichnet und bestimmt die Größe und Gestalt der Bizellen. Während für Festkörper-NMR-Messungen magnetisch orientierte Bizellen mit einem q-Wert $>2,5$ genutzt werden, eignen sich für NMR-

spektroskopische Untersuchungen in Flüssigkeit sich schnell bewegende, isotrope Mizellen mit einem q -Verhältnis $<1,5$.

In Abbildung 3.2 sind die Strukturformeln einiger in dieser Arbeit verwendeten Lipide und Detergenzien dargestellt.

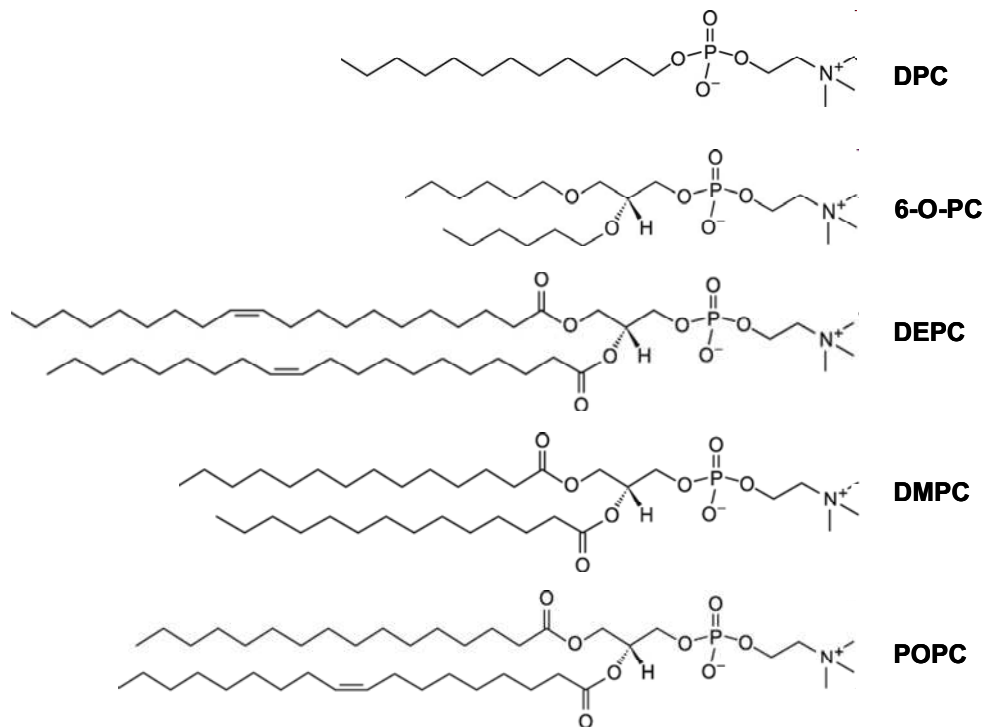


Abbildung 3.2: Beispiele einiger Lipide die für die Rekonstitution von PDGFR β -TM in membranimitierenden Systemen genutzt wurden. DPC: Dodecylphosphocholin, 6-O-PC: 1,2-di-O-Hexyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin, DEPC: 1,2-Dieicosenoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin, DMPC: 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin, POPC: 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin.

3.2 Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie stellt eine gut etablierte optische Methode zur Ermittlung der Sekundärstruktur von Peptiden und Proteinen dar [79].

Hierbei wird linear polarisiertes Licht, welches durch Überlagerung zweier gegenläufiger, links und rechts zirkular polarisierter Komponenten gleicher Phase und Frequenz entsteht, verwendet. Trifft dieses auf eine optisch aktive (chirale) Substanz, kommt es zur unterschiedlichen Absorption der beiden Komponenten, wobei elliptisch polarisiertes Licht entsteht. Die eigentliche Messgröße der CD-Spektroskopie, die Elliptizität, ist proportional zur Absorptionsdifferenz der links und rechts zirkular polarisierten Lichtwellen und wird im CD-Spektrum in Abhängigkeit der Wellenlänge dargestellt [80]. Wird die links absorbierende Komponente stärker absorbiert, führt dies zu einer positiven Bande im Spektrum, während umgekehrt eine negative Bande aus der stärkeren Absorption der rechten Komponente herrührt. Voraussetzung für die Messung eines CD-Signals ist das Vorhandensein eines Chromophors in der Nähe des chiralen Zentrums, was bei Proteinen aufgrund der Peptidbindung in unmittelbarer Nähe des chiralen C α -Atoms gegeben ist. Für Proteine und Peptide liegt der interessierende Messbereich zwischen ca. 180 – 300 nm, da hier die charakteristischen Absorptionsbanden der verschiedenen Sekundärstrukturelemente auftreten (siehe Abbildung 3.3).

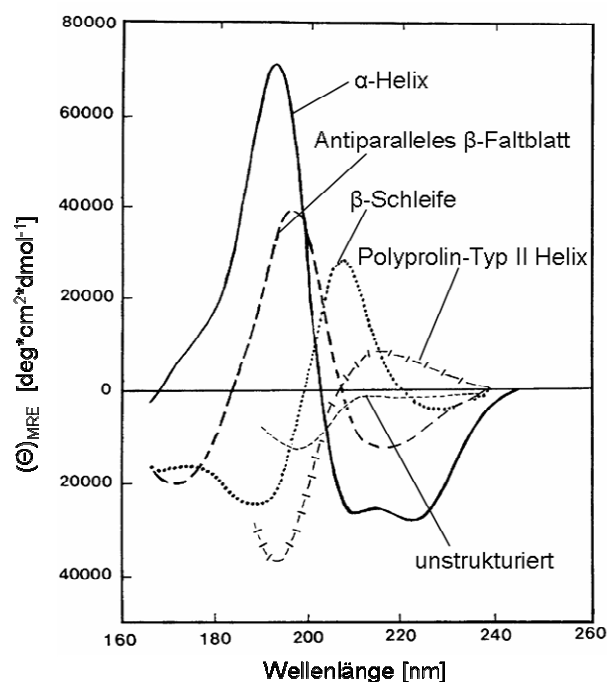


Abbildung 3.3: Charakteristische CD-Spektren für die jeweiligen reinen Sekundärstrukturen von Proteinen. Abbildung verändert nach [79].

Diese kommen aufgrund der unterschiedlichen räumlichen Orientierungen der Peptidbindungen innerhalb der Sekundärstrukturelemente, sowie der spezifischen Kopplungen der partiellen π -Systeme, zustande. Dabei kommt es im Fern-UV-Bereich (180 – 260 nm) zur Anregung von elektronischen $n\text{-}\pi^*$ - und $\pi\text{-}\pi^*$ -Übergängen.

Durch Anregung der Elektronen vom nicht-bindenden π -Orbital der Peptidbindung und vom n -Orbital des freien Elektronenpaares des Sauerstoffatoms in das anti-bindende π^* -Orbital kommen beispielsweise die ausgeprägten Banden einer α -Helix bei 193 nm, 208 nm und 222 nm zustande (durchgezogene Kurve in Abbildung 3.3) [81].

Um aus einem experimentell erhaltenen CD-Spektrum die fraktionalen Sekundärstrukturanteile bestimmen zu können, muss dieses dekonvoluiert werden. Dies ist möglich, da das CD-Spektrum eines Proteins eine Linearkombination der Basisspektren aller vorkommenden Sekundärstrukturelemente zeigt. Hierzu wurden verschiedene mathematische Algorithmen wie beispielsweise CONTIN-LL [82,83], Selcon 3 [84] oder CDSSTR [85,86] entwickelt, welche auf unterschiedlichen mathematischen Ansätzen basieren. Die hierbei verwendeten Basisspektren werden aus den CD-Spektren von Referenzproteinen berechnet, deren genauen Sekundärstrukturanteile bereits aus der Röntgenkristallographie oder aus NMR-Untersuchungen bekannt sind. Die Qualität der anhand der Algorithmen berechneten Sekundärstrukturanteile wird durch den Vergleich des experimentell bestimmten CD-Spektrums mit dem aus den Sekundärstrukturanteilen zurückgerechneten Spektrums bemessen. Der dadurch erhaltene NMRSD (normalized root mean squared deviation)-Wert sollte für CONTIN-LL und CDSSTR kleiner 0,1 und für Selcon 3 kleiner 0,25 sein, um eine gute Anpassung der rekonstituierten Spektren an die experimentell erhaltenen CD-Spektren sicherzustellen [87]. Der NMRSD-Wert wird wie folgt berechnet:

$$NMRSD = \left[\frac{\sum (\theta_{\text{exp}} - \theta_{\text{cal}})^2}{\sum (\theta_{\text{exp}})^2} \right]^{1/2}$$

θ_{exp} : experimentell ermittelte molare Elliptizität, θ_{cal} : berechnete molare Elliptizität aus der Sekundärstrukturauswertung

Darüber hinaus kann anhand der Einzelwellenlängen-Auswertung der α -helikale Anteil eines Proteins abgeschätzt werden [81,88]. Diese Methode basiert auf der

Annahme, dass ein Protein, welches einen α -helikalen Anteil von 100 % besitzt, einen molaren Elliptizitätswert bei 220 nm von $-37.000 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ aufweist. Der α -Helixanteil f_H kann nach folgender Formel bestimmt werden:

$$f_H = \frac{[\theta]_{MRE}^{220}}{[\theta_{H\infty}]_{MRE}^{220} \cdot (1 - 3 / N)}$$

f_H : fraktionaler α -Helixanteil der Probe, $[\theta]_{MRE}$: mittlere molare Elliptizität bei 220 nm der Probe, $[\theta_{H\infty}]_{MRE}$: mittlere molare Elliptizität bei 220 nm einer α -Helix mit 100 % Helixanteil, N: Anzahl der Aminosäuren des Proteins

Hierbei wird als Einheit der Elliptizität die mittlere molare Elliptizität pro Peptidbindung verwendet (θ_{MRE}), wobei die Elliptizität auf die molare Konzentration und die Schichtdicke der Probe normiert ist.

$$[\theta]_{MRE} = \frac{\theta}{10 \cdot c_r \cdot d} [\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}] \quad \text{und} \quad c_r = \frac{n \cdot c_g}{M_w} [\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}]$$

θ : Elliptizität [deg], d: Schichtdicke [cm], n: Anzahl Peptidbindungen, c_g : Proteinkonzentration [g/L], M_w : Molekulargewicht [g/mol]

Die CD-Spektroskopie kann jedoch nicht dazu genutzt werden, die Struktur von einzelnen, bestimmten Bereichen eines Proteins aufzuklären, da sie nur globale Informationen über die fraktionalen Anteile der vorkommenden Sekundärstrukturelemente gibt. Die Vorteile der CD-Spektroskopie liegen darin, dass die Messungen schnell und einfach durchzuführen sind und die Methode zudem nur geringe Proteinkonzentrationen von typischerweise 50 – 100 $\mu\text{g/ml}$ beim Einsatz von Küvetten mit 1 mm Schichtdicke erfordert. Weiterhin sind, im Vergleich zur hochauflösenden NMR, keine kostspieligen Isotopenmarkierungen nötig. Daher wird CD oftmals zu Beginn der Strukturbestimmung von Proteinen herangezogen, um die optimalen Rekonstitutionsbedingungen wie pH-Wert, Temperatur, Detergenz- und Lipidsystem zu etablieren.

3.3 Orientierte CD-Spektroskopie

Die Orientierte CD-Spektroskopie (OCD), welche auf den Prinzipien der CD-Spektroskopie beruht (siehe Kapitel 3.2), kann zur Bestimmung der Ausrichtung α -helikaler Proteine in orientierten Lipidmembranen verwendet werden [89].

Für die in einer α -Helix vorkommenden Elektronen-Übergänge existieren Übergangsdipolmomente der Peptidbindung, die senkrecht oder parallel zur Helixachse polarisiert sind. In Abhängigkeit von der Orientierung der Helix bezüglich des einfallenden zirkular polarisierten Lichts, kommt es zu unterschiedlich starken Wechselwirkungen zwischen den Übergangsdipolmomenten und dem elektrischen Feldvektor, was sich in den unterschiedlichen Linienformen des OCD-Spektrums widerspiegelt (Abbildung 3.4).

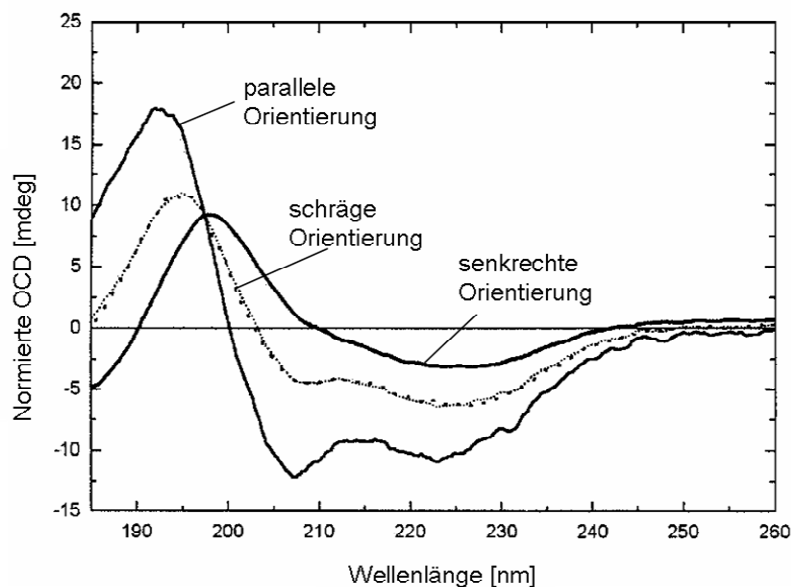


Abbildung 3.4: OCD-Spektren α -helikaler Membranproteine mit senkrechter (transmembran), schräger und parallel zur Membranoberfläche verlaufender Orientierung. Abbildung modifiziert übernommen aus [90].

Der $n\text{-}\pi^*$ -Übergang verursacht sowohl bei einer senkrecht als auch bei einer parallel zur Membranoberfläche ausgerichteten α -Helix eine intensive Bande bei ca. 224 nm. Der $\pi\text{-}\pi^*$ -Übergang spaltet hingegen in drei Energieniveaus auf, wobei das Übergangsdipolmoment des ersten parallel zur Helixachse polarisiert ist, während die der anderen beiden senkrecht dazu polarisiert sind. Bei einer in Bezug auf die Membranoberfläche parallel orientierten Helix kommt es nun zu einer starken Wechselwirkung zwischen dem ersten $\pi\text{-}\pi^*$ -Übergang und dem zirkular polarisierten Licht, was zu einer intensiven Bande bei ca. 208 nm führt. Die positive Bande bei ca.

190 nm resultiert aus den beiden anderen nicht unterscheidbaren π - π^* -Übergängen. Die Bande bei ca. 208 nm kann als „Fingerabdruck-Bande“ des OCD-Spektrums angesehen werden, da deren Anwesenheit eine parallele Orientierung des Proteins in der Membran anzeigt. Je aufrechter das Protein in die Membran eingebettet ist, desto mehr verliert die Bande an Intensität, bis sie bei einer völlig senkrechten Orientierung schließlich völlig verschwindet oder sogar positive Werte annehmen kann. Ähnlich dem CD-Spektrum zeigt auch das OCD-Spektrum die zeitlich gemittelte Summe aller vorhandenen Orientierungen eines Proteins in Lipid-Modellmembranen. Weiterhin kann aus einem OCD-Spektrum der Neigungswinkel, welcher den Winkel zwischen der Helixachse des in der Lipidmembran orientierten Proteins und der Membrannormalen beschreibt, abgeschätzt werden. Der Neigungswinkel τ der Helix kann mit Hilfe des Ordnungsparameters S_h ermittelt werden [91,92].

$$s_h = (3 \cdot \cos^2 \tau - 1) / 2 \rightarrow \cos \tau = \sqrt{(2 \cdot S_h + 1) / 3}$$

Der helikale Ordnungsparameter S_h charakterisiert in einem Ensemble von Peptid-Helices mit einer Verteilung von Winkeln zwischen Membrannormale und Helixachsen in makroskopisch orientierten Lipiddoppelschichten den Mittelwert und wird wie folgt berechnet:

$$S_h = S_{Ref} \cdot \frac{f_{Ref}}{f_H} \cdot \frac{([\theta]^0 - [\theta]^V)_{Probe}^{210nm}}{([\theta]^0 - [\theta]^V)_{Ref}^{210nm}}$$

S_{Ref} : Ordnungsparameter des Referenzproteins ($S_{Ref} = 0,62$), f_{Ref} : fraktionaler α -Helixanteil des Referenzproteins ($f_H = 0,74$), f_H : fraktionaler α -Helixanteil der zu bestimmenden Peptid-Probe, $[\theta]^0$: molarer Elliptizitätswert der orientierten Probe bei 210 nm, $[\theta]^V$: molarer Elliptizitätswert der nicht-orientierten Probe bei 210 nm, $([\theta]^V - [\theta]^0)$: Differenzwert des Referenzproteins bei 210 nm ($19.000 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$), Referenzprotein: Melittin

Für die Abschätzung des Helix-Neigungswinkels wird der α -Helixanteil, welcher aus dem CD-Spektrum der entsprechenden Lipid-Vesikel Probe bestimmt werden kann, (siehe Kapitel 3.2) und der Differenzwert bei 210 nm des orientierten OCD- und des isotropen CD-Spektrums herangezogen. Hierbei wird angenommen, dass alle unstrukturierten Anteile des Proteins isotrop vorliegen und somit nur die helikalen Anteile, welche für das Auftreten der Bande bei 210 nm verantwortlich sind, berücksichtigt werden.

Die Ermittlung der molaren Elliptizität θ_{MRE} bei 210 nm des OCD-Spektrums erfolgt analog zu den in Kapitel 3.2 beschriebenen CD-Spektren unter Einbeziehung der Fläche der orientierten Probe.

$$[\theta]_{MRE} = \frac{\theta \cdot M_w}{10 \cdot n \cdot c_g \cdot d} = \frac{\theta \cdot M_w \cdot V}{10 \cdot n \cdot m \cdot d} = \frac{\theta \cdot M_w \cdot F}{10 \cdot n \cdot m} [\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}]$$

$$c_g = \frac{m}{V} [\text{g} / \text{L}]$$

θ : gemessene Elliptizität [deg], M_w : Molekulargewicht [g/mol], n : Anzahl Peptidbindungen, m : Proteinmenge [g], d : Schichtdicke [cm], F : Kreisfläche OCD-Probe [cm²], V : Volumen der Probe [L], c_g : Konzentration der Probe [g/L]

3.4 Kernspinmagnetresonanz (NMR)-Spektroskopie

Mittels NMR-Spektroskopie kann die dreidimensionale Struktur von Membranproteinen aufgeklärt werden. Die Kerne ¹H, ¹³C und ¹⁵N sind aufgrund ihres Kernspins von $I=1/2$ gut für NMR-spektroskopische Messungen geeignet. Allerdings weisen ¹³C und ¹⁵N nur eine geringe natürliche Häufigkeit auf (¹³C: 1,1 %, ¹⁵N: 0,4 %), weswegen eine Anreicherung dieser Isotope im zu untersuchenden Protein notwendig ist. Dies kann beispielsweise durch die biosynthetische Herstellung der Proteine in Minimalmedium erfolgen, welches als einzige Stickstoff- bzw. Kohlenstoffquelle isotonenangereichertes Ammoniumsalz bzw. Glukose enthält. Für Kerne mit einem Kernspin $1/2$ gibt es drei verschiedene Wechselwirkungen, die neben der Stärke des Magnetfelds B_0 die Resonanzfrequenz des Spins beeinflussen. Sowohl in der Festkörper-NMR als auch in der Flüssigkeits-NMR handelt es sich bei diesen Wechselwirkungen um die chemische Verschiebung, die skalare Kopplung und die dipolare Kopplung.

Die chemische Verschiebung ist von der Orientierung des Moleküls abhängig, was durch den chemischen Verschiebungstensor ausgedrückt wird. In Flüssigkeiten kommt es aufgrund der schnellen Reorientierung der Moleküle zur Ausmittelung aller Orientierungen, wobei nur die isotrope chemische Verschiebung gemessen wird. Im Festkörper hingegen ist die Bewegung der Moleküle eingeschränkt, wobei das entsprechende Spektrum die Summe der Signale aller Orientierungen des Moleküls beinhaltet (anisotrope chemische Verschiebung).

Die skalare Kopplung (auch indirekte Spin-Spin- oder J-Kopplung genannt) kommt überwiegend in der Flüssigkeits-NMR vor und ermöglicht den Magnetisierungstransfer zwischen kovalent verbundenen Kernen. Der Transfer,

welcher über die Bindungselektronen vermittelt wird, kann sich dabei über maximal drei Bindungen erstrecken. Durch die Kopplung der Kerne kommt es zur Verstärkung bzw. Abschwächung des am Kernort wirkenden Magnetfelds, was zur Änderung der Resonanzbedingung führt und eine charakteristische Aufspaltung der Signale im NMR-Spektrum bewirkt. Die Kopplung der Atomkerne ermöglicht, dass die Magnetisierung gezielt von einem Kern auf einen anderen übertragen werden kann. Dies wird zum Beispiel bei den zur Proteinstrukturaufklärung genutzten heteronuklearen Experimenten angewandt (siehe Kapitel 3.4.1).

Die dipolare Kopplung (direkte Spin-Spin-Kopplung) bezeichnet die Wechselwirkung der magnetischen Momente der Kernspins durch den Raum. Dieser Effekt ist als Kern-Overhauser-Effekt bekannt, welcher auf der Kreuzrelaxation beruht und ist für die Proteinstrukturbestimmung mittels NMR bedeutend, da hierbei wichtige Distanzinformationen gewonnen werden können. Die Stärke der dipolaren Wechselwirkung ist in erster Näherung proportional zu $1/r^6$, wobei r der Abstand der Kerne ist.

3.4.1 Heteronukleare mehrdimensionale NMR-Experimente zur Zuordnung der chemischen Verschiebungen und Strukturaufklärung

3.4.1.1 Das HSQC-Experiment

HSQC steht für Heteronuclear Single Quantum Coherence und stellt das Basisexperiment für die Strukturbestimmung von Proteinen mittels Flüssigkeits-NMR dar. Hierbei handelt es sich um ein zweidimensionales Experiment, welches die chemische Verschiebung zweier über J-Kopplung verknüpfter Heterokerne miteinander korreliert. Bei Proteinen wird die chemische Verschiebung der Protonen mit der von Stickstoff (^{15}N) oder Kohlenstoff (^{13}C) korreliert. Abbildung 3.5 zeigt die Pulssequenz des HSQC-Experiments, welche eine doppelte INEPT (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarisation Transfer)-Pulsfolge aufweist. Dabei wird der Magnetisierungspuls ausgehend von einem Proton auf den direkt gebundenen (unempfindlichen) Heterokern übertragen. In der darauf folgenden inkrementierten t_1 -Zeit evolviert die Magnetisierung am Heterokern, wobei ein 180° -Puls die heteronukleare Kopplung refokussiert.

Ein 90° -Puls auf beide Kerne bewirkt, dass die Magnetisierung wieder zurück auf die Protonen transferiert wird, wonach die Detektion unter Entkopplung des Heterokerns erfolgt.

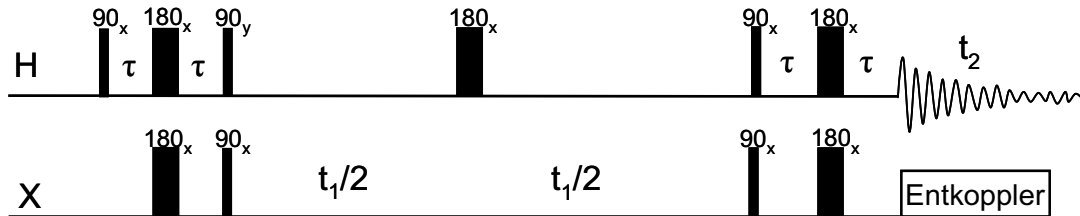


Abbildung 3.5: Pulssequenz des HSQC-Experiments. Die obere Linie zeigt die Pulse auf dem Protonen-Kanal, die untere auf dem des Heterokerns. Der erste und zweite 90° -Protonenpuls weisen eine um 90° verschiedene Phase auf. Als τ wird die Verzögerungszeit zwischen den verschiedenen Pulsen bezeichnet und t_1 gibt die Evolutionszeit an. Abbildung angelehnt an [93].

In einem $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum wird demnach die Stickstofffrequenz mit der Frequenz des direkt gebundenen Amidprotons verknüpft. Da jedes Signal im HSQC-Spektrum ein an ein ^{15}N -Atom gebundenes Proton repräsentiert, sollte für jede Aminosäure eines Proteins aufgrund der Peptidbindung ein Signal erscheinen. Ausnahme ist hierbei Prolin, welches kein Amidproton besitzt. Weiterhin können auch Signale der NH-Protonen der Seitenketten von Asparagin, Glutamin, Histidin, Arginin, Lysin und Tryptophan detektiert werden.

Das HSQC-Spektrum kann als „Fingerabdruck“ für ein Protein angesehen werden. Anhand der Dispersion der Signale kann abgeschätzt werden, ob das Protein gut gefaltet vorliegt oder ob es zur Aggregation neigt, was sich meist in breiten, überlappenden Linienformen widerspiegelt. Zudem weist es eine hohe Sensitivität auf, so dass kleinste Strukturänderungen, wie beispielsweise eine Ligandenbindung oder Umfaltung des Proteins, detektiert werden können. Für die Aufklärung der Proteinstruktur sind jedoch weitere Experimente nötig, welche Auskunft über die Konnektivitäten der Aminosäuren sowie deren räumliche Nachbarschaft geben. Diese werden in den nachfolgenden Abschnitten vorgestellt.

3.4.1.2 Tripelresonanzexperimente

Die Tripelresonanzexperimente werden zur Zuordnung der Frequenzen der Aminosäuren eines Proteins genutzt. Hierbei handelt es sich um dreidimensionale Experimente, in welchen drei verschiedene Kernsorten miteinander korreliert werden. Daher sind Proteine, welche mit ^{15}N und ^{13}C doppeltmarkiert sind, nötig. Die Tripelresonanzexperimente zeichnen sich durch ihre hohe Empfindlichkeit aus. Grund dafür ist der effiziente Magnetisierungstransfer, der ausschließlich über die starken ^1J - und ^2J -Kopplungen stattfindet. Weiterhin sind die Spektren sehr vereinfacht, da für jede Frequenz nur wenige Signale detektiert werden. Somit ist es möglich, die Korrelationen zwischen benachbarten Aminosäuren zu finden und diese den Resonanzen zuzuweisen.

Es gibt eine Reihe verschiedener Tripelresonanzexperimente, wobei in diesem Abschnitt nur diejenigen vorgestellt werden, welche in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden: HNCA, HN(CO)CA, CBCANH, CBCA(CO)NH.

Die Benennung der einzelnen Experimente erfolgt nach dem Verlauf des Magnetisierungstransfers, wobei alle Kerne der Reihe nach aufgezählt werden. Diejenigen Kerne, über welche die Magnetisierung nur transferiert wird und nicht detektiert werden, sind in Klammern gesetzt. Abbildung 3.6 zeigt schematisch den Magnetisierungstransfer für die einzelnen Experimente.

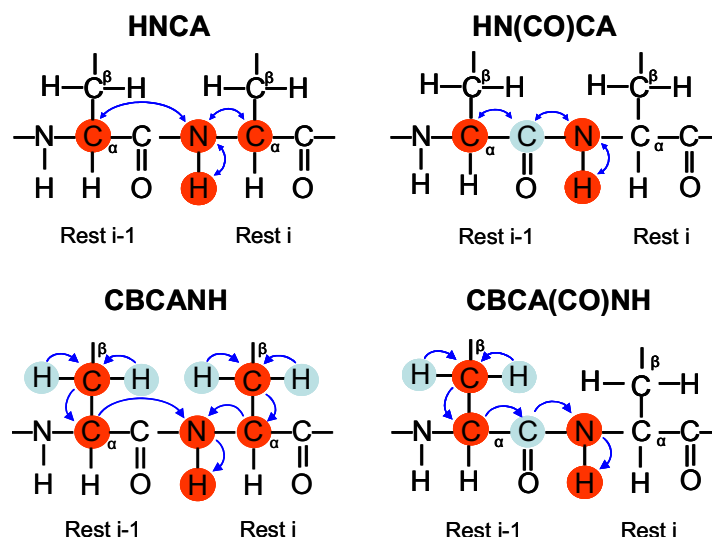


Abbildung 3.6: Übersicht der verschiedenen Tripelresonanzexperimente. Die Frequenzen der rot hinterlegten Kerne werden detektiert, während die hellblau hinterlegten nur zum Magnetisierungstransfer dienen. Die blauen Pfeile beschreiben sowohl die Richtung als auch den Weg des Magnetisierungstransfers. Abbildung verändert übernommen aus [94].

Beispielsweise startet die Magnetisierung im HNCA-Experiment vom Amidproton und wird auf den Amidstickstoff übertragen, welcher in der ersten Dimension gemessen wird. Anschließend erfolgt der Magnetisierungstransfer zum $\text{C}\alpha$ -Kern, welcher in der zweiten Dimension detektiert wird. Daraufhin erfolgt der Transfer wieder zurück zum Amidproton, welches schließlich in der dritten Dimension aufgenommen wird. Zudem kommt es zum Magnetisierungstransfer des $\text{C}\alpha$ -Kerns der vorausgehenden Aminosäure, da sich die Kopplung des Stickstoffs zum vorausgehenden $\text{C}\alpha$ -Kern ($^2J_{\text{NC}} = 11 \text{ Hz}$) nicht wesentlich von der zum „eigenen“ $\text{C}\alpha$ -Kern unterscheidet ($^1J_{\text{NC}} = 7 \text{ Hz}$).

Das HNCA-Spektrum und auch die anderen Tripelresonanz-Spektren besitzen die drei Frequenzachsen $^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{15}N und ^{13}C , wobei eine $^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{15}N -Projektion dem HSQC-Spektrum entspricht (Abbildung 3.7). Auf der $^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{15}N -Frequenz jedes Amidprotons zeigt das HNCA-Spektrum in der ^{13}C -Dimension zwei Kreuzsignale. Ein Kreuzsignal stammt von dem „eigenen“ $\text{C}\alpha$ -Atom, wobei das andere vom vorausgehenden Rest stammt. Zur manuellen Auswertung werden häufig zweidimensionale „Streifen“ des Spektrums verwendet, wobei zu jedem Signal der $^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{15}N -Ebene die entsprechende ^{13}C -Frequenzachse dargestellt wird.

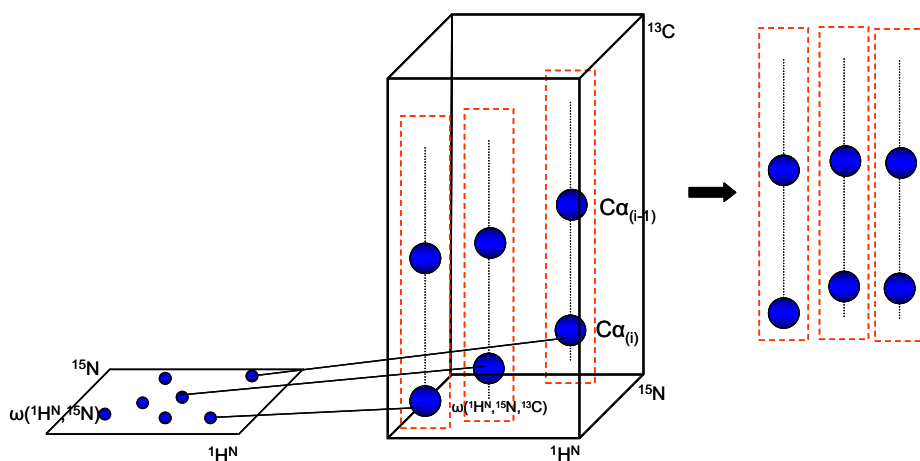


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung des dreidimensionalen HNCA-Spektrums. Eine Projektion des Spektrums in die $^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{15}N -Ebene entspricht dem HSQC-Spektrum. Auf jedem $^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{15}N -Frequenzpaar gibt es zwei Kreuzsignale, wobei eines vom $\text{C}\alpha$ -Atom derselben Aminosäure stammt ($\text{C}\alpha_{(i)}$), und das andere von der vorhergehenden Aminosäure ($\text{C}\alpha_{(i-1)}$). Zur Analyse des Spektrums werden zweidimensionale Streifen verwendet, welche die ^{13}C -Frequenzen zu jedem ^1H , ^{15}N -Signal darstellen. Abbildung zur Verfügung gestellt von Dr. Claudia Muhle-Goll, KIT Karlsruhe.

Um zwischen dem Kreuzsignal des „eigenen“ und des vorausgehenden C α -Kerns unterscheiden zu können, kann das HN(CO)CA-Spektrum genutzt werden. Da hierbei die Magnetisierung über die Carbonylgruppe verläuft, ist der Transfer zur „eigenen“ Aminosäure ausgeschlossen und es kann nur das C α -Kreuzsignal der vorangegangenen Aminosäure detektiert werden. Die sequentielle Zuordnung der Aminosäuren anhand eines Vergleichs des HNCA- und HN(CO)CA-Spektrums ist oftmals nicht eindeutig, da die Unterscheidung zwischen dem „eigenen“ und dem vorausgehenden C α -Atom häufig erschwert ist. Die chemischen Verschiebungen der C α -Atome unterscheiden sich oft nur geringfügig, da sich die Atome alle in einer ähnlichen chemischen Umgebung befinden, was zu Signalüberlappungen führt. Weiterhin kann anhand dieser beiden Spektren keine eindeutige Zuordnung zu bestimmten Aminosäuren getroffen werden, da die C α -Signale alleine nicht charakteristisch genug sind. Deswegen werden noch die beiden Experimente CBCANH und CBCA(CO)NH verwendet. Diese liefern zusätzliche Informationen, da sie Signale zu dem C β -Atom der korrelierenden Aminosäure aufweisen. Das CBCANH-Spektrum zeigt, wie auch das HNCA-Spektrum, in der ^{13}C -Dimension zwei Kreuzsignale der C α -Atome (eigenes und das der vorausgehenden Aminosäure), wobei als zusätzliche Information die C β -Kreuzsignale der eigenen und vorausgehenden Aminosäure auftreten. Das CBCA(CO)NH zeigt das C α - und C β -Kreuzsignal der vorausgehenden Aminosäure, so dass durch Vergleich der beiden Spektren eindeutig bestimmt werden kann, welche Signale von der eigenen bzw. vorausgehenden Aminosäure stammen.

In Abbildung 3.8 ist exemplarisch eine Streifenmatrix gezeigt, in welcher durch Vergleich des CBCANH- mit dem CBCA(CO)NH-Spektrum sequenziell benachbarte Aminosäuren zugeordnet werden können. Da die chemischen Verschiebungen für manche Aminosäuren charakteristische Werte aufweisen, wie beispielsweise das C β -Atom von Threonin und Alanin bei ca. 70 ppm bzw. 20 ppm, kann eine eindeutige Zuweisung der Streifen zu bestimmten Aminosäuretypen erfolgen.

Die Kenntnis der chemischen Verschiebungen des C α -, C β -, H N - und N-Atoms jeder Aminosäure ist die Grundvoraussetzung für die Zuordnung der Seitenketten-Signale anhand des (H)C(CO)NH-Experiments. Das dreidimensionale (H)C(CO)NH-Spektrum zeigt in der ^{13}C -Dimension die Kreuzsignale aller Kohlenstoffatome der kompletten Seitenkette der vorausgehenden Aminosäure. Die Zuordnung der Signale erfolgt durch Vergleich mit dem CBCANH-Spektrum. Weiterhin hilfreich sind die

charakteristischen chemischen Verschiebungen der Seitenkettenresonanzen bestimmter Aminosäuren. Beispielsweise weist das C δ -Atom von Arginin eine chemische Verschiebung von ca. 43 ppm auf, während das von Isoleucin eine chemische Verschiebung von ca. 13 ppm besitzt.

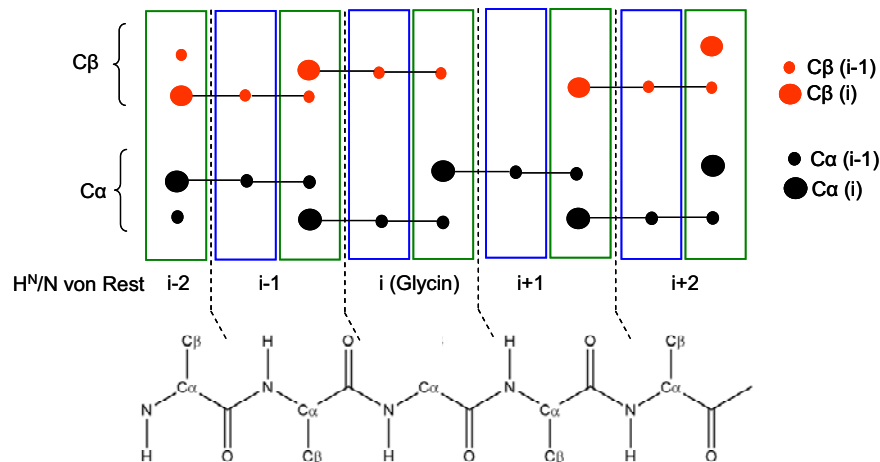


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der Zuordnung des Proteinrückgrats anhand zweidimensionaler Streifen. Der Vergleich des CBCANH-Spektrums (grüne Streifen) mit dem CBCA(CO)NH-Spektrum (blaue Streifen) ermöglicht das Auffinden sequentiell benachbarter Aminosäuren. Abbildung zur Verfügung gestellt von Dr. Claudia Muhle-Goll, KIT Karlsruhe.

3.4.1.3 Das NOESY- und TOCSY-Experiment

Die wichtigste Strukturinformation in der NMR-Spektroskopie von Proteinen stellen die Korrelationen räumlich benachbarter Protonen dar. Diese Informationen können anhand eines NOESY (Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy)-Experiments gewonnen werden. Das NOESY-Spektrum zeigt für alle Protonen ein Signal, deren Abstand kleiner ist als $\sim 5 \text{ \AA}$. Daher werden auch Protonen miteinander korreliert, die in der Primärstruktur weit voneinander entfernt liegen, sich aber aufgrund der Tertiärstruktur in räumlicher Nachbarschaft befinden. Grundlage des Experiments ist der bereits erwähnte Kern-Overhauser-Effekt, welcher auf der dipolaren Wechselwirkung der Kernspins beruht. Die Intensität I eines Kreuzsignals im NOESY-Spektrum ist dabei in erster Näherung umgekehrt proportional zu der sechsten Potenz des Abstands r der korrelierenden Kerne.

$$I \propto \frac{1}{r^6}$$

Daher können aus den Signalintensitäten Atomabstände ermittelt werden, welche die Grundlage für die Berechnung einer dreidimensionalen Proteinstruktur darstellen.

In einem dreidimensionalen ^{13}C - bzw. ^{15}N -editierten NOESY-Spektrum werden die Protonenfrequenzen mit der des Heterokerns korreliert, wobei die ^{13}C - bzw. ^{15}N -Resonanzfrequenzen die dritte Dimension darstellen. Dies führt zur leichteren Identifizierung der Signale, da diese durch die zusätzliche Dimension aufgefächert werden. Das ^{15}N -editierte NOESY-Spektrum zeigt die Korrelation eines jeden Amidprotons eines Proteins mit dem kovalent gebundenen Amidstickstoff und allen räumlich benachbarten Protonen. Im ^{13}C -editierten NOESY-Experiment werden die aliphatischen Protonen mit dem kovalent verknüpften ^{13}C -Kern und allen Protonen, die räumlich benachbart sind, korreliert. Das Spektrum besitzt einen hohen Informationsgehalt, wobei NOE-Kontakte zwischen den einzelnen Seitenketten eines Proteins erhalten werden, welche die Anordnung der Sekundärstrukturelemente und damit die Tertiärstruktur beschreiben. Für die Zuordnung der Protonenresonanzen des ^{13}C -NOESY-Spektrums ist die Kenntnis der chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome der Seitenkette erforderlich, welche anhand der im Kapitel 3.4.1.2 beschriebenen Tripelresonanzexperimente gewonnen werden.

Im TOCSY (Total Correlation Spectroscopy)-Experiment findet der Magnetisierungstransfer im Vergleich zum NOESY-Experiment ausschließlich über die skalare J-Kopplung statt. Hierbei werden alle Protonen eines Spinsystems, das heißt einer Aminosäure, miteinander korreliert. Das Spektrum zeigt ein für jede Aminosäure charakteristisches Signalmuster, welches dem Spinsystem entspricht. Durch den Vergleich des ^{15}N -NOESY- mit dem ^{15}N -TOCSY-Spektrum kann die sequenzspezifische Zuordnung eines Proteins getroffen werden. Anhand des TOCSY-Spektrums können dabei die einzelnen Aminosäuren identifiziert werden, wobei das NOESY-Spektrum die Verknüpfung der Aminosäurereste zeigt. Das TOCSY-Spektrum kann in der Regel nur für kleine Proteine bis zu ca. 100 Aminosäuren ausgewertet werden. Bei größeren Proteinen kommt es aufgrund der hohen Korrelationszeiten zu einer schnellen Relaxation, die zur Verbreiterung der Signale führt.

3.4.2 Strukturbestimmung von symmetrischen Dimeren

Um die Struktur eines homodimeren Proteins, welches aus zwei symmetrischen Molekülen besteht, mittels NMR-Spektroskopie zu bestimmen, müssen intermolekulare NOE-Kontakte zwischen den beiden monomeren Untereinheiten eindeutig charakterisiert werden.

Anhand eines konventionellen NOESY-Experiments kann jedoch nicht unterschieden werden, ob ein NOE-Signal von zwei Protonen stammt, welche sich innerhalb des gleichen Monomers befinden (intramolekularer NOE-Kontakt), oder ob der NOE-Kontakt von zwei Protonen herrührt, welche von unterschiedlichen Monomeren stammen (intermolekularer NOE-Kontakt). Grund für die Ununterscheidbarkeit zwischen intra- und intermolekularen NOE-Kontakten ist deren identische Resonanzfrequenz, welche durch die gleiche chemische Umgebung hervorgerufen wird.

Durch Erschaffung eines Heterodimers kann die Symmetrie des Homodimers gebrochen werden. Dies kann durch unterschiedliche Isotopenmarkierung erreicht werden, wobei ein Monomer des Dimers uniform ^{13}C markiert vorliegt, während das andere Monomer mit ^{12}C unmarkiert ist (Abbildung 3.9). Experimentell kann dies durch Mischen gleicher Teile von ^{13}C markiertem mit unmarkiertem Protein erzielt werden, woraus eine statistische Verteilung von vollständig markiertem, markiertem-unmarkiertem und vollständig unmarkiertem Dimer von 1:2:1 resultiert.

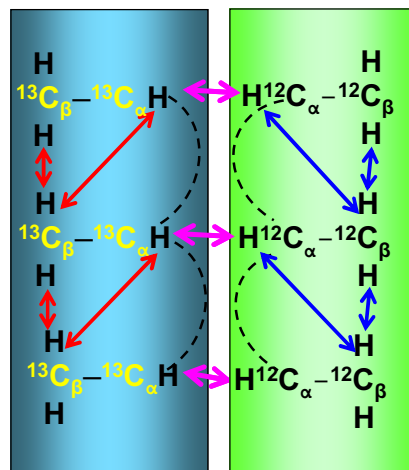


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung eines „heterodimeren“ Proteins, welches aus je einem ^{13}C uniform markiertem und einem unmarkiertem monomeren Protein besteht. Die Messung eines 3D ^{13}C -gefilterten, ^{13}C -editierten NOESY-Experiments ermöglicht die Unterscheidung zwischen intermolekularen NOE-Kontakten (rosa Pfeile) und intramolekularen NOE-Kontakten (rote bzw. blaue Pfeile).

Die Messung eines dreidimensionalen ^{13}C -gefilterten, ^{13}C -editierten NOESY-Experiments einer solchen „Heterodimer-Probe“ erlaubt die ausschließliche Detektion der intermolekularen NOE-Kontakte. In Abbildung 3.10 ist das Funktionsprinzip eines solchen Experiments schematisch dargestellt.

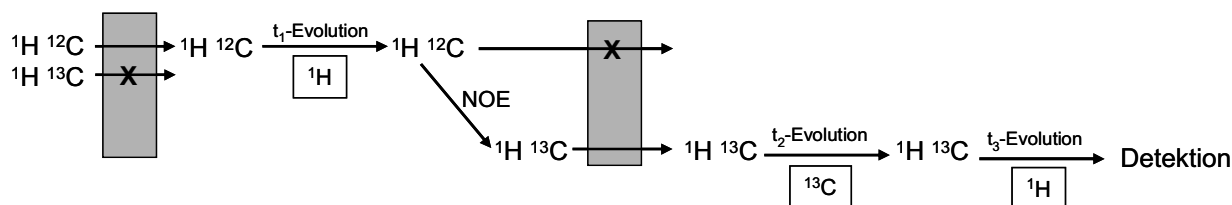


Abbildung 3.10: Schematischer Ablauf eines 3D ^{13}C -gefilterten, ^{13}C -editierten NOESY-Experiments. Die grauen Kästen stellen die Filter dar, welche aus selektiven Pulsen bestehen. Diese lassen ausschließlich den Magnetisierungstransfer zwischen Protonen zu, welche an ein ^{12}C - bzw. ^{13}C -Atom gebunden sind.

Hierbei startet der Magnetisierungstransfer von einem Proton, welches an ein ^{12}C -Atom gebunden ist, wobei der Transfer von Protonen, welche an ein ^{13}C -Atom gebunden sind, durch einen speziellen Filter blockiert wird. Während der inkrementierten t_1 -Evolutionszeit entwickelt sich die chemische Verschiebung der Protonen. In der anschließenden Mischzeit erfolgt der Magnetisierungstransfer über die dipolare Wechselwirkung auf ein räumlich benachbartes Proton, welches an ein ^{13}C -Atom gebunden ist. Ein weiterer Filter sorgt dafür, dass der Transfer auf ein ^{12}C -gebundenes Proton unterdrückt wird. Hierbei handelt es sich beispielsweise um eine INEPT-Pulssequenz (siehe HSQC-Experiment, Kapitel 3.4.1.1), welche zur Editierung des ^{13}C -Kerns verwendet wird. Nach der anschließenden inkrementierten t_2 -Evolutionszeit, in welcher sich die chemische Verschiebung auf dem ^{13}C -Kern entwickelt, wird die Magnetisierung wieder zurück auf das ^{13}C gebundene Proton transferiert. In der darauf folgenden t_3 -Evolutionszeit entwickelt sich die chemische Verschiebung der Protonen, wonach es zur Detektion des FID-Signals kommt.

Das erste Filterelement in diesem Experiment basiert auf dem sogenannten low-pass J-Filter und setzt sich aus selektiven Pulsen zusammen, welche nur auf ^{13}C -Kerne wirken. In Abbildung 3.11 ist die Pulssequenz aufgeführt.

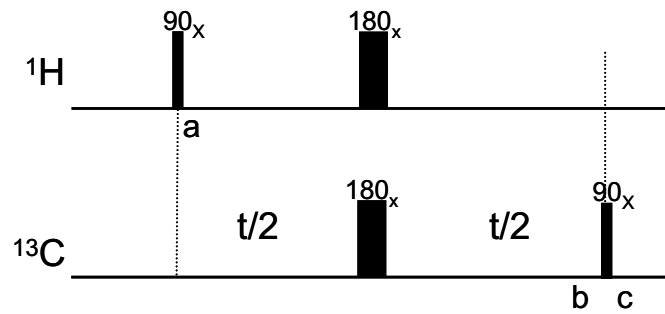


Abbildung 3.11: Pulssequenz des low-pass J-Filters. Die obere Linie zeigt die Pulse auf dem ^1H -Kanal, die untere die auf dem ^{13}C -Kanal. t bezeichnet die Evolutionszeit. Abbildung modifiziert übernommen aus [95].

Nach dem Produktoperatorformalismus [96] erzeugt der erste 90° -Puls auf Protonen, welche an ein ^{13}C - oder ^{12}C -Atom gebunden sind, zum Zeitpunkt a transversale Magnetisierung $-I_y$. Nach der Hälfte der Evolutionszeit wird simultan ein 180° -Puls auf die ^1H - und ^{13}C -Kerne eingestrahlt, wodurch die chemische Verschiebung der Protonen refokussiert wird und nur die heteronukleare Kopplung aktiv ist (homonukleare Kopplung wird dabei vernachlässigt). Entspricht die Evolutionszeit t $(2J_{\text{CH}})^{-1}$ so besitzen zum Zeitpunkt b alle an ein ^{13}C -Atom gebundenen Protonen $2I_xS_z$ Magnetisierung, während alle an ein ^{12}C gebundenen Protonen $+I_y$ Magnetisierung aufweisen. Der anschließende 90° -Puls auf den Heterokern bewirkt zum Zeitpunkt c, dass alle ^{13}C gebundenen Protonen in nicht detektierbare Null- und Doppelquantenkohärenzen vom Typ $-I_xS_y$ umgewandelt werden. Im Unterschied dazu weisen am Ende der Filtersequenz alle an ^{12}C gebundenen Protonen $+I_y$ Magnetisierung auf, welche detektiert werden kann.

Ein dreidimensionales ^{13}C -gefiltertes, ^{13}C -editiertes NOESY-Spektrum ist im Vergleich zu dem konventionellen ^{13}C -editierten NOESY-Spektrum stark vereinfacht, da es im Idealfall ausschließlich die intermolekularen NOE-Signale zeigt. Die Zuordnung der intermolekularen NOEs erfolgt durch den direkten Vergleich beider Spektren. Allerdings ist die Auswertung der Spektren häufig durch das Auftreten von Artefakt-Signalen erschwert. Diese können beispielsweise von dem umgebenden Lösungsmittel stammen. Im Falle des in dieser Arbeit untersuchten Membranproteins kommt es zu NOE-Kontakten mit den Detergenzmolekülen, da diese nicht vollständig deuteriert vorliegen und zudem in großem Überschuss vorhanden sind.

Weiterhin sind die Experimente für eine bestimmte J-Kopplungsstärke optimiert. Da diese aber stark variabel ist ($^1J_{\text{HC}} \approx 130 - 200 \text{ Hz}$), kann dies zusätzlich zu Artefakten im Spektrum führen.

4. Material und Methoden

4.1 Materialien

Für die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Arbeiten wurden die folgenden Geräte, Materialien und Chemikalien verwendet.

4.1.1 Geräte

Autoklav	Varioklav, H + P Labortechnik Sanoclav S-ECZ, Wolf VX-95, Systec 2540 EL, Systec
Brutschrank	Incucell, MMM Medcenter Einrichtungen
CD-Messküvetten	Suprasil QS, Hellma Optik
CD-Spektropolarimeter	J-810, Jasco
Gasbrenner	Schütt flammy S, Schütt Labortechnik
Gasweiche	MF-2, Amicon
Photo-Print Video-Geldokumentationssystem	21 5-SI, PeqLab Biotechnologie
UV-Detektor (Geldokumentationssystem)	TCP-20.M, PeqLab Biotechnologie
Gelelektrophorese (Agarose)	PerfectBlue, PeqLab Biotechnologie
Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	Mini-Protean Tetra Cell, BioRad
Heizblock	HB-2, Wealtec Corp.

HPLC	Jasco
bestehend aus:	
2 Pumpen	2087-PU
Hochdruckmischer	2080-DHD
Säulenthermostat	CO-200
Diodenarray-Detektor	MD-2010
Steuerbox	Jasco-LC-Net II
manueller Injektor	Rheodyne
HPLC-Säule	Polymer C18 Protein & Peptide, Semi-Prep, 218TP510, 250 x 10 mm, Vydac
Inkubationsschüttler	G25, New Brunswick Scientific Innova 44, New Brunswick Scientific
Lyophilisator	Alpha I-6, Christ Alpha 2-4 LD, Christ
Magnetrührer mit Heizplatte	RCT, IKA Labortechnik
Massenspektrometer (MALDI-TOF)	Autoflex III, Bruker Daltonics
Mikrowelle	M1712 N, Samsung
NanoDrop	Fisher Scientific
NMR-Spektrometer	Avance, 500 MHz (Ultrashield) Wide Bore, Bruker Biospin Avance, 600 MHz (Ultrashield) Standard Bore, Bruker Biospin Avance 900 MHz (Ultrashield) Standard Bore, Bruker Biospin

NMR-Probenkopf	HXY Triple Resonance, statisch, austauschbare Spule, Bruker Biospin TBI Triple Resonance, Bruker Biospin TXI Triple Resonance Cryo, Bruker Biospin
OCD-Spektropolarimeter	J-815, Jasco
OCD-Quartz-Plättchen	Suprasil QS, Hellma Optik
pH-Messgerät	QpH 70, VWR International pH 315i, WTH
Pipetten 0,5 - 10 µl, 2 - 20 µl, 10 - 100 µl, 50 - 200 µl, 100 - 1000 µl 1 - 5 ml, 2 – 10 ml	Reference, Eppendorf Finnpipette, Thermo Scientific
Reinraumbank	Herasafe, Heraeus Instruments
Reinstwasseranlage	Milli-Q, Millipore
Rotationsverdampfer	
Manometer	CVC 211, Vacuumbrand KG
Heizbad	461, Büchi
Kühler	cool-care, Heijden-Labortechnik
Vakuumpumpe	MZ 20C, Vacuumbrand GmbH & Co
Stromversorger	Power Pac 300, BioRad Power Pac Basic, BioRad
Trockenschrank	600, Memmert
Ultraschallgeräte	Branson Sonifier 250, G. Heinemann Ultraschall und Labortechnik Sonorex super RK510, Bandelin electronic

UV/VIS-Spektrophotometer	SmartSpec Plus, BioRad
Vortexer	Genie K-550-GE, Bender und Hobein
Waagen	
Ablesbarkeit 0,1 g	PB 3001, Mettler Toledo
Ablesbarkeit 0,0001 g	CP 64, Sartorius
Ablesbarkeit 0,001 mg	M2P, Sartorius
Wasserbad	006T, Lauda
Wasserbad Thermostat	A100, Lauda
Western-Blot Apparatur	PerfectBlue Semi-Dry Elektroplotter, PeqLab Biotechnologie
Zentrifugen	3-18 K, Sigma Avanti Centrifuge J-25, Beckmann Centrifuge 5415 C, Eppendorf Centrifuge 5417 R, Eppendorf RC 5B Plus, Sorvall L8-60M, Beckmann
Zentrifugenrotoren	JA-14, Beckmann JLA-9100, Beckmann SWI-28, Beckmann SS-34, Sorvall 19776-H, Sigma
4.1.2 Verbrauchsmaterialien	
Aluminiumfolie	Roth
Autoklavierband	Comply Indicator Tape, 3M
Blotting-Papier	Gel-Blotting-Papiere, Schleicher & Schuell
Deckgläser (7,5 x 12 mm)	Marienfeld

Dialysemembran (1 kDa MWCO)	Zellutrans V-Serie, Roth
Einmalspritzen (20 ml, 10 ml, 1 ml)	Injekt, B. Braun
Einmalspritze für Gummistopfen	BD Micro U40, Becton Dickinson
NMR-Gefäß	
Einmalsterilfilter (0,22 µm)	Rotilabo-Spritzenfilter steril, Roth
Einmalsterilfilter (0,45 µm)	Rotilabo-Spritzenfilter unsteril, Roth
Glasgefäße mit Schraubverschluss	Autosampler vials EZ:faast, Phenomenex
Halbmikroküvetten (1 ml)	Sarstedt
Nitrozellulosemembran	PeqLab Biotechnologie
NMR-Gefäß (5 mm)	New Era Enterprises
NMR-Glascontainer (7,7 x 2,2 x 30 mm)	New Era Enterprises
NMR-Probenröhrchen mit Kappe (5 mm)	Wilmad LabGlass
Parafilm	Laboratory film, American National Can
Pasteur-Pipetten	WU Mainz
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen (1 ml, 200 µl, 10 µl)	Sarstedt
Pipettenspitzen (5 ml)	Finnpipette, Thermo Scientific
Reaktionsgefäße (2,0 ml, 1,5 ml, 0,5 ml)	Sarstedt
Wägepapier	MN 226, Macherey-Nagel
Wägeschälchen	Roth
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon-Tubes, Sarstedt

4.1.3 Chemikalien

6-O-PC	Avanti Polar Lipids
Acetonitril	Fisher Scientific
Acrylamid	AppliChem
Agar	Roth
Agarose	Sigma
Ameisensäure	Roth
Aminocaproat	Fluka
Ammoniumchlorid	Fluka
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem
Ammoniumsulfat	Acros Organics

Ammoniumsulfat (^{15}N -markiert)	Spectra Stable Isotopes
Ampicillin-Natriumsalz	Roth
Bactotrypton	Roth
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid	Roth
Chloramphenicol	Fluka
4-Chlor-1-naphtol	AppliChem
Coomassie Brilliant Blue R250	Sigma
Deoxycholsäure-Na-Salz	Roth
DEPC	Avanti Polar Lipids
Deuteriumoxid 99,9 % (D_2O)	Sigma
Dihydroxybenzoesäure	Aldrich
Dikaliumhydrogenphosphat	AppliChem
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem
1,4-Dithio-DL-threitol (DTT)	Fluka
DLPC	Avanti Polar Lipids
DMPC	Avanti Polar Lipids
DMPG	Avanti Polar Lipids
Dodecylphosphocholin (DPC)	Anatrace
Dodecylphosphocholin deuteriert (DPC-d38)	Anatrace
DPPC	Avanti Polar Lipids
Essigsäure	Roth
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka
Glukose	Fluka
Glukose (^{13}C -markiert)	Spectra Stable Isotopes
Glycerin	Roth
Guanidin Hydrochlorid	Roth
Hefeextrakt	Roth
Hydroxylamin	Sigma
Igepal CA-630	Sigma
IPTG	AppliChem

Isopropanol	Fisher Scientific
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem
LPPC	Avanti Polar Lipids
Magnesiumsulfat	Merck
Methanol	Fisher Scientific
Natriumazid	Roth
Natriumchlorid	Fisher Scientific
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem
Natriumhydroxid	Merck
Natriumphosphat	Fluka
Polyethylenglycol (PEG)	Fluka
POPC	Avanti Polar Lipids
Salzsäure	AppliChem
Stickstoff	Messer Griesheim
Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth
Thiamin-Hydrochlorid	AppliChem
Trichloressigsäure	AppliChem
Tricin	AppliChem
Trifluoressigsäure	Sigma
Trifluorethanol	Acros
Tween 20	Roth
Wasserstoffperoxid	Roth
YbCl ₃	Sigma

4.1.4 Marker

Protein-Marker	PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas
DNA-Marker	GeneRuler™ 1kb Plus, Fermentas

4.1.5 Kits für die Molekularbiologie

DNA-Extraktion	QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen
Plasmid-Isolierung	peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I Classic Line, PeqLab Biotechnologie

4.1.6 Vektoren

pMMHb/E5

Induktion: IPTG

Promotor: T7

Resistenz: Amp

Tag: *trp*-ΔLE und His₉-Tag

hergestellt von Dr. S. Benamira,

Universität Karlsruhe

pBluescript II KS (-)/PDGFRβ-TM

Induktion: IPTG

Promotor: T7

Resistenz: Amp

hergestellt von Eurofins MWG Operon

Ebersberg

4.1.7 Bakterienstämme

E. coli BL21(DE3) pLysS

Novagen

E. coli XL1-Blue

Novagen

E. coli DH5α

Stratagene

4.1.8 Enzyme

Lysozym

Applichem

*Bam*HI

Fermentas

*Hind*III

Fermentas

T4-DNA-Ligase

Fermentas

4.1.9 Antikörper

Anti-mouse HRP conjugate

Calbiochem

Mouse anti-HisTag monoclonal

Novagen

4.1.10 Kulturmedien, Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie

LB-Medium	10 g Trypton 10 g NaCl 5 g Hefeextrakt mit bidest. H ₂ O auf 1 L auffüllen pH = 7,5 einstellen, autoklavieren
M9-Salz-Lösung (10x)	70 g Na ₂ HPO ₄ 30 g KH ₂ PO ₄ 5 g NaCl 10 g (¹⁵ NH ₄) ₂ SO ₄ mit bidest. H ₂ O auf 1 L auffüllen autoklavieren
M9-Minimalmedium	1x M9-Salz-Lösung 0,1 mM CaCl ₂ 1 mM MgSO ₄ 50 mg/L Thiamin-HCl 2 g/L ¹³ C-Glukose 1 % LB-Medium
MgSO ₄ (1 M)	12 g MgSO ₄ mit bidest. H ₂ O auf 100 ml auffüllen, steril filtrieren, bei 4 °C lagern
CaCl ₂ (0,1 M)	1,1 g CaCl ₂ mit bidest. H ₂ O auf 100 ml auffüllen, steril filtrieren, bei 4 °C lagern
Thiamin (50 mg/ml)	500 mg Thiamin mit bidest. H ₂ O auf 10 ml auffüllen steril filtrieren, bei -20 °C lagern

Ampicillin (100 mg/ml)	1 g Ampicillin mit bidest. H ₂ O auf 10 ml auffüllen steril filtrieren, bei -20 °C lagern
Chloramphenicol (20 mg/ml)	200 mg Chloramphenicol in 10 ml Ethanol lösen, steril filtrieren, bei -20 °C lagern
IPTG-Lösung (200 mM)	0,476 mg IPTG mit bidest. H ₂ O auf 10 ml auffüllen steril filtrieren, bei -20 °C lagern
Glukose (20 %)	10 g Glukose mit bidest. H ₂ O auf 50 ml auffüllen steril filtrieren, bei 4 °C lagern
SOC-Medium	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,6 g NaCl 0,2 g KCl mit bidest. H ₂ O auf 1 L auffüllen pH = 7,0 einstellen, autoklavieren 10 ml MgCl ₂ (1 M) 10 ml MgSO ₄ (1 M) 10 ml Glukose (2 M) bei -20 °C lagern
TSS-Lösung	1,23 g MgSO ₄ ·7H ₂ O 10 g PEG 5 ml DMSO mit LB-Medium (pH = 6,5) auf 100 ml auffüllen, bei -20 °C lagern

für die Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer (50x)	242 g Tris-HCl 57,1 ml Essigsäure 100 ml EDTA-Lösung (0,5 M) mit bidest. H ₂ O auf 1 L auffüllen pH = 7,0 einstellen
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg Ethidiumbromid mit bidest. H ₂ O auf 1 ml auffüllen

für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Anodenpuffer	121,1 g Tris 5 L dest. H ₂ O pH = 8,9 einstellen
Kathodenpuffer	12,11 g Tris 17,92 g Tricin 1 g SDS mit dest. H ₂ O auf 1 L auffüllen
4x Tris-HCl-Lösung	6,05 g Tris mit bidest. H ₂ O auf 100 ml auffüllen pH = 6,8 einstellen, filtrieren 0,4 g SDS zugeben
Tris-HCl-Lösung	182 g Tris mit bidest. H ₂ O auf 500 ml auffüllen pH = 8,45 einstellen, filtrieren 1,5 g SDS zugeben

SDS-PAGE Probenpuffer (2x)	<p>1,75 ml Tris (1 M, pH = 6,8)</p> <p>1,5 ml Glycerin</p> <p>5 ml SDS (10%)</p> <p>0,24 g DTT</p> <p>1 Spatelspitze Bromphenolblau</p> <p>mit bidest. H₂O auf 10 ml auffüllen,</p> <p>bei 4 °C lagern</p>
Färbe-Lösung	<p>250 mg Coomassie G-250</p> <p>50 ml Essigsäure</p> <p>450 ml Ethanol</p> <p>mit bidest. H₂O auf 1 L auffüllen</p>
Fixier-Lösung	<p>500 ml Ethanol</p> <p>100 ml Essigsäure</p> <p>mit bidest. H₂O auf 1 L auffüllen</p>
Entfärber-Lösung	<p>250 ml Ethanol</p> <p>50 ml Essigsäure</p> <p>mit bidest. H₂O auf 1 L auffüllen</p>
APS-Lösung (100 mg/ml)	<p>100 mg Ammoniumpersulfat</p> <p>mit bidest. H₂O auf 1 ml auffüllen,</p> <p>bei 4 °C lagern</p>
für den Western-Blot	
Anodenpuffer I	<p>36,34 g Tris-HCl</p> <p>200 ml Methanol</p> <p>mit bidest. H₂O auf 1 L auffüllen</p> <p>pH = 10,4 einstellen</p>
Anodenpuffer II	<p>3,03 g Tris-HCl</p> <p>200 ml Methanol</p> <p>mit bidest. H₂O auf 1 L auffüllen,</p> <p>pH = 10,4 einstellen</p>

Kathodenpuffer	5,24 g Aminocaproat 0,1 g SDS mit bidest. H ₂ O auf 1 L auffüllen, pH = 7,6 einstellen
PBS-Puffer	0,54 g KH ₂ PO ₄ 2,85 g Na ₂ HPO ₄ 6,72 g NaCl mit dest. H ₂ O auf 1 L auffüllen
PBS-blocking Puffer	3 g BSA 500 µl Tween 20 mit PBS-Puffer auf 100 ml auffüllen, bei 4 °C lagern
PBS-Tween-Puffer	100 µl Tween 20 mit PBS-Puffer auf 100 ml auffüllen
Chlornaphtol-Lösung	0,3 g 4-Chlor-1-Naphtol mit Methanol auf 10 ml auffüllen, bei -20 °C lagern
für die Isolierung von Inclusion Bodies	
Lösung I	50 mM Tris-HCl (pH = 8) 15 % Glycerin 50 µg/ml Lysozym 1 mM NaN ₃
Lösung II	50 mM Tris-HCl (pH = 8) 1% Deoxycholsäure 1% Igepal CA-630 1 mM NaN ₃

Lösung III	20 mM Tris-HCl (pH 8)
	6 M Guanidin-HCl
	0,5 M NaCl

für die proteolytische Spaltung mittels Hydroxylamin

Verdau-Lösung	5,5 g Hydroxylamin
	23 g Guanidin-HCl
	20 ml LiOH-Lösung (4,5 M), filtriert
	pH = 9,0 einstellen

für die HPLC

Eluent A	80 % H ₂ O bidest.
	20 % Acetonitril
	0,1 % TFA
	entgasen
Eluent B	100 % Acetonitril

4.2 Mikrobiologische Arbeitsmethoden

4.2.1 Arbeiten unter sterilen Bedingungen

Alle Arbeiten, die eine keimfreie Umgebung erfordern, werden unter der Reinraumbank durchgeführt. Die Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen werden im Autoklaven bei 121 °C und einem Wasserdampfüberdruck von 1 bar für 20 Minuten sterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen werden mit Hilfe eines Filters mit einer Porengröße von 0,22 µm steril filtriert. Glasgefäße werden mit Aluminiumfolie abgedeckt und im Trockenschrank bei 200 °C für 3 Stunden entkeimt.

4.2.2 Herstellung von Agar-Platten

Es werden 500 ml frisch hergestelltes LB-Medium mit 7,5 g Agar versetzt und ein pH-Wert von 7,5 eingestellt. Nach dem die autoklavierte Lösung auf ca. 40 °C abgekühlt ist, werden die entsprechenden Antibiotika zugesetzt. Anschließend wird das Medium zügig in Petrischalen gegossen.

4.2.3 Ausstrich aus einer Glycerinkultur

Mit Hilfe einer ausgeglühten Impföse wird etwas Zellkultur aus einer Glycerinkultur entnommen und auf einer Agar-Platte ausgestrichen, so dass die Bakterienmenge verdünnt wird. Die Agar-Platte wird über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

4.2.4 Herstellung einer Glycerinkultur

Die längerfristige Aufbewahrung von Bakterienzellen erfolgt in einer Glycerinkultur bei -80 °C. Hierzu werden 700 µl aus einer dicht gewachsenen Übernachtskultur entnommen und mit 300 µl 50 %iger Glycerinlösung vermischt.

4.2.5 Anfertigung einer Übernachtskultur

Unter der Reinraumbank wird in einen 500 ml Erlenmeyerkolben 100 ml LB-Medium und die entsprechenden Antibiotika (Ampicillin 100 µg/ml, Chloramphenicol 20 µg/ml) vorgelegt. Mit einer ausgeglühten Impföse wird eine Bakterienkolonie von einer frisch ausgestrichenen Agar-Platte entnommen und in das Kulturmedium überführt. Die Übernachtskultur wird im Schüttler bei 200 rpm und 37 °C über Nacht inkubiert.

4.3 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

4.3.1 Plasmid-DNA Isolierung

Die Plasmidisolierung wird mit dem peqGOLD Plasmid Minirep Kit I (Classic-Line) der Firma PeqLab durchgeführt. Hierfür werden 4 ml einer Übernachtskultur für eine Minute bei 10000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Bakterienpellet wird nun in 250 µl der RNase-haltigen Lösung I resuspendiert. Es werden 250 µl Lösung II zugegeben und durch sechsmaliges Invertieren des Tubes vermischt, wodurch es zum Aufschluss der Zellen kommt. Nach einer zweiminütigen Inkubationszeit wird das nun klare Lysat mit 350 µl Lösung III versetzt. Nach mehrmaligem Invertieren bildet sich ein weißer, flockiger Niederschlag aus, welcher bei 10000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert wird. Der klare Überstand wird auf eine HiBind-Miniprep Zentrifugensäule gegeben und für 1 Minute bei 10000 rpm zentrifugiert. Die an das Säulenmaterial gebundene Plasmid-DNA wird mit 500 µl HB-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wird zweimal mit jeweils 750 µl DNA-Waschpuffer gewaschen, wobei der Waschpuffer durch Zentrifugation bei 10000 rpm für eine Minute entfernt wird. Die Säule wird zur Elution in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß

gestellt und mit 100 µl Elutionspuffer überschichtet. Es wird nochmals für eine Minute bei 10000 rpm zentrifugiert wobei die Plasmid-DNA von der Säule gewaschen wird.

4.3.2 Ethanolfällung der Plasmid-DNA

Für die Fällung der Plasmid-DNA werden 50 µl der isolierten Plasmid-DNA in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 125 µl 100 %igem, eiskaltem Ethanol und 5 µl Natriumacetat (3 M, pH = 4,8) versetzt. Anschließend wird das Eppendorfgefäß für mindestens 30 Minuten bei -80 °C inkubiert. Danach wird 20 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entnommen. Nun werden 125 µl eiskaltes, 70 %iges Ethanol zu dem Pellet hinzugegeben und für weitere 5 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet unter der Reinraumbank an der Luft getrocknet.

4.3.3 Plasmid-DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung wird von der Firma MWG Operon, Ebersberg (Deutschland) durchgeführt. Hierfür wird die nach der Ethanolfällung erhaltene Plasmid-DNA an die Firma geschickt.

4.3.4 Verdau der DNA mit Restriktionsenzymen

Um ein DNA-Fragment in einen Vektor einzuklonieren, müssen beide zueinander komplementäre Enden aufweisen. Dies wird durch einen enzymatischen Verdau mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen erreicht. Wird ein Doppelverau mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen durchgeführt, so muss die Verdaureaktion in einer Pufferlösung erfolgen, in welcher beide Enzyme mindestens 70 % aktiv sind. Für den Verdau werden die Restriktionsenzyme in einem 30-fachen Überschuss verwendet, wobei die DNA-Konzentration mittels UV-Quantifizierung bestimmt wird. Die Verdau-Lösung wird bei 37 °C für 1,5 Stunden inkubiert. Die Enzyme werden anschließend durch eine zehnminütige Inkubation bei 80 °C deaktiviert.

4.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente des Restriktionsverdaus erfolgt mittels Agarose-Gelelektrophorese. Hierfür wird ein 1 %iges bzw. 2 %iges Agarose-Gel benutzt. Es werden 1 g bzw. 2 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle aufgelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 40 °C werden 5 µl einer

Ethidiumbromid-Stammlösung hinzugegeben. Die Lösung wird in eine Gießschale mit Probenkamm gefüllt. Sobald das Gel ausgehärtet ist, wird es in eine Elektrophoresekammer gestellt und mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Der Probenkamm wird entfernt und die Proben nach Verdünnen mit 6x Loading Dye-Puffer (Verhältnis Loading Dye-Puffer:Probe beträgt 1:5) in die Probentaschen pipettiert. Die Elektrophorese wird bei einer Spannung von 120 V für ca. 1 Stunde durchgeführt. Die Detektion der DNA-Banden erfolgt durch Fluoreszenz mit dem Ethidiumbromid, welches mit der DNA interkaliert.

4.3.6 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Zur Isolierung der aufgetrennten DNA-Fragmente aus einem Agarose-Gel werden die entsprechenden Banden unter einer UV-Lampe mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit aufgereinigt. Hierzu wird die ausgeschnittene Gelbande in ein Eppendorfgefäß überführt. Pro 100 mg Gelgewicht werden 300 µl Puffer QG zugesetzt. Das Gelstück wird bis zum vollständigen Auflösen bei 50 °C inkubiert. Die nun gelbe Lösung wird daraufhin mit Isopropanol versetzt (pro 100 mg Gelgewicht 100 µl Isopropanol). Die Lösung wird auf eine „QIAquick“-Zentrifugensäule aufgetragen, wobei die DNA an das Säulenmaterial bindet und durch Zentrifugation von anderen Bestandteilen abgetrennt wird. Anschließend wird die DNA mit 500 µl QG-Puffer und 750 µl ethanolhaltigem PE-Puffer gewaschen. Nach jedem Waschritt wird für 1 Minute bei 14000 rpm zentrifugiert und der jeweilige Durchfluss verworfen. Die Säule wird in ein sauberes Eppendorfgefäß gestellt und die DNA mittels 50 µl Elutionspuffer von der Membran gewaschen.

4.3.7 Ligation

Für die Ligationsreaktion werden die Plasmid-DNA und das zu insertierende DNA-Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. In einem Eppendorfgefäß werden die zu ligierenden DNA-Fragmente in Ligationspuffer vorgelegt und T4-DNA-Ligase hinzugegeben. Die Menge der Ligase beträgt hierbei 2 U. Der Ligationsansatz wird bei 22 °C für 1 Stunde inkubiert. Dann erfolgt die Deaktivierung der Ligase durch zehnminütiges Erhitzen auf 65 °C.

4.3.8 Herstellung hitzekompetenter Zellen

Es wird eine Übernachtskultur von den entsprechenden Zellen hergestellt. Hiervon werden 200 µl entnommen und mit 20 ml frischem LB-Medium verdünnt. Die Zellkultur wird bei 37 °C bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,3 - 0,4 AU inkubiert. Die Zellen werden bei 5000 rpm für 20 Minuten abzentrifugiert und auf Eis gestellt. Das Zellpellet wird in 1 ml eiskalter TSS-Lösung resuspendiert, aliquotiert (100 µl Zellkultur pro Eppendorfgefäß) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Benutzung werden die Zellen bei -80 °C gelagert.

4.3.9 Hitzetransformation

Es werden 3 µl der Plasmid-DNA-Lösung mit 100 µl hitzekompetenten Zellen vermischt und für 30 Minuten auf Eis gestellt. Die Transformation erfolgt durch einen Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sekunden. Die Zellen werden 2 Minuten auf Eis gestellt und 1 ml SOC-Medium hinzupipettiert. Anschließend werden die Zellen bei 37 °C eine Stunde lang inkubiert und daraufhin auf Agar-Platten ausplattiert.

4.4 Proteinchemische Methoden

4.4.1 Expression in Voll- und Minimalmedium

Zur Proteinexpression im Milligramm-Maßstab werden 200 ml einer Übernachtskultur bei 5000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert. Für die Herstellung von unmarkiertem Protein wird die Expression in LB-Medium durchgeführt, während für die Herstellung von uniform ^{15}N - bzw. ^{15}N , ^{13}C -markiertem Probenmaterial M9-Minimalmedium benutzt wird. Dieses enthält als einzige Stickstoff bzw. Kohlenstoffquelle $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ bzw. ^{13}C -Glukose. Es werden sechs 2L-Kolben mit jeweils 500 ml antibiotikahaltigem Kulturmedium mit den resuspendierten Zellen angeimpft, so daß die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) ca. 0,1 – 0,2 AU beträgt. Die Kulturen werden im Schüttler bei 37 °C inkubiert bis sie eine optische Dichte von ca. 0,6 - 0,8 AU aufweisen. Durch Zugabe von jeweils 0,5 ml einer 1M IPTG-Lösung wird die Proteinexpression gestartet. Der Verlauf der Expression wird durch stündliches Messen des OD_{600} -Wertes verfolgt. Nach 4 - 5 Stunden werden die Zellen bei 5000 rpm für 20 Minuten abzentrifugiert. Die Lagerung des Zellpellets erfolgt bis zum Zellaufschluss bei -80 °C.

4.4.2 Zellaufschluss und Isolierung der Inclusion Bodies

Die Isolierung der Inclusion Bodies, welche das Fusionsprotein *trp*- Δ -LE-PDGFR β -TM enthalten, erfolgt mittels eines Ultraschallaufschlusses. Hierzu werden die Zellen zunächst auf Eis aufgetaut. Anschließend werden diese in 30 ml Lysozym-haltiger Lösung I resuspendiert, wodurch es zum Abbau der Zellmembranen kommt. Zusätzlich wird der Aufschluss durch eine neunminütige Ultraschallbehandlung unter intensiver Kühlung (3 x 3 Minuten, 65 % Leistung) vervollständigt. Die Suspension wird für 40 Minuten bei 17000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 30 ml Lösung II resuspendiert und erneut mit Ultraschall behandelt (3 x 3 Minuten, 65 % Leistung). Durch die in Lösung II enthaltenen Detergenzien kommt es zur Solubilisierung von Membranbestandteilen, welche in dem darauffolgenden Zentrifugationsschritt (19000 rpm, 4 °C, 40 Minuten) abgetrennt werden. Das Pellet, welches die Inclusion Bodies enthält, wird in 6 M Guanidin-haltiger Lösung III mittels Ultraschallbehandlung (3 x 3 Minuten, 65 % Leistung) aufgelöst. Anschließend kommt es durch Zugabe von 300 ml bidestilliertem Wasser zur Fällung der Einschlusskörperchen in Form eines weißen, flockigen Niederschlags. Die Inclusion Bodies werden durch Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C für eine Stunde abgetrennt und lyophilisiert.

4.4.3 Proteolytische Spaltung mit Hydroxylamin

Proteine können zwischen den Aminosäuren Asparagin und Glycin durch Hydroxylamin spezifisch gespalten werden [97]. Das Fusionsprotein *trp*- Δ -LE-PDGFR β -TM enthält eine Asparagin-Glycin-Schnittstelle zwischen dem His₉-Tag bzw. *trp*- Δ -LE-Tag und der PDGFR β -TM Sequenz. Durch die Spaltung mittels Hydroxylamin kann PDGFR β -TM von den Tags abgetrennt werden. Es werden ca. 200 mg lyophilisierte Inclusion Bodies in 45 ml Verdau-Lösung aufgelöst und bei 45 °C über Nacht gerührt. Durch die Erniedrigung des pH-Wertes auf 3,0 mit Ameisensäure wird der Verdau am nächsten Morgen gestoppt. Die Aufreinigung der Verdau-Produkte erfolgt mittels HPLC.

4.4.4 Aufreinigung mittels Umkehr-Phase HPLC

Die Aufreinigung der Spaltprodukte nach dem Hydroxylamin-Verdau erfolgt mittels Umkehr-Phase (Reversed Phase) HPLC. Hierbei wird die Probe mit einem polaren Laufmittel durch eine Säule, welche aus langkettigen Kohlenwasserstoffketten besteht und die stationäre Phase darstellt, gepumpt. Die Probenbestandteile wechselwirken spezifisch mit der stationären Phase und verbleiben daher unterschiedlich lange auf der Säule, wodurch es zur Auftrennung des Probengemisches kommt. Der Nachweis der einzelnen Substanzen erfolgt anhand eines UV-Detektors, wobei Proteine anhand der Absorption bei 220 nm der Peptidbindung bzw. zwischen 260 - 280 nm der aromatischen Aminosäuren nachgewiesen werden. Die Aufreinigung von PDGFR β -TM erfolgt bei 35 °C mit Hilfe einer semipräparativen C18-Polymersäule unter Benutzung des in Tabelle 4.1 aufgeführten Gradienten. Dabei werden pro Lauf 3 ml der filtrierten Verdau-Lösung mittels einer 5 ml Probenschleife auf die Säule aufgetragen.

Tabelle 4.1: Zur RP-HPLC-Aufreinigung der Spaltprodukte des Hydroxylamin-Verdaus verwendeter Gradient.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Flussrate [ml/min]
0	50	50	4
1	50	50	4
16	15	85	4
24	5	95	4
26	95	5	4
27	50	50	7
32	50	50	7

4.4.5 Dialyse

Die Entfernung der organischen Lösungsmittel sowie noch vorhandener Salze erfolgt nach der HPLC-Aufreinigung mittels Dialyse. Dazu werden die gesammelten HPLC-Fraktionen zunächst am Vakuum-Rotationsverdampfer eingeeengt, mit 2 M NaOH neutralisiert und in Dialysemembranen (Ausschlussgröße 1 kDa) gefüllt. Die Dialyse erfolgt gegen bidest. H₂O über 2 - 3 Tage, wobei täglich mindestens dreimal das Wasser ausgetauscht wird. Nach der Dialyse erfolgt eine Lyophilisation, wobei das Protein als weißes Pulver erhalten wird. Die Dialyseschläuche werden mehrmals mit bidest. H₂O gewaschen und in 0,05 % NaN₃-Lösung bei 4 °C aufbewahrt.

4.5 Analytik

4.5.1 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentrationsbestimmung wird an einem Spektrophotometer (NanoDrop) der Firma Fisher Scientific durchgeführt. Das Spektrophotometer wird zuerst mit der Pufferlösung ohne Substanz kalibriert. Anschließend werden 0,5 – 1 µl der Probe auf den Piedestal pipettiert. Der Messarm wird nach unten gestellt, so dass sich eine Flüssigkeitssäule (0,01 – 1 mm) ausbildet und die Messung gestartet werden kann. Nach der Messung wird der Piedestal mit bidest. H₂O gereinigt.

4.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-Gelelektrophorese wird ein 16 %iges Tris-Tricin-Gel hergestellt (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Zusammensetzung des Polyacrylamid-Gels. Die Menge entspricht der Herstellung von zwei Gelen.

Komponenten	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid (30 %)	5,2 ml	670 µl
Tris-HCl-Puffer (pH = 8,45)	3,3 ml	-
Tris-HCl-Puffer 4x (pH = 6,8)	-	1,29 ml
Glycerin	1,7 ml	-
Wasser	400 µl	3,2 ml
APS (10 %)	70 µl	35 µl
TEMED	3,5 µl	2 µl

Alle Komponenten, bis auf das Ammoniumpersulfat (APS), werden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen zusammengegeben. Durch Zugabe von APS wird die Polymerisation gestartet. Das Trenngel wird zügig zwischen die zwei Glasplatten der Minigelkammer gegossen und mit Wasser überschichtet. Nachdem das Gel auspolymerisiert ist, wird das Sammelgel auf das Trenngel pipettiert. Zur Bildung der Probenfächer wird ein Probenkamm in das Sammelgel eingebracht. Die Proben werden 1:1 mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt. Die Menge des SDS-Probenpuffers für die Expressionsreihe errechnet sich wie folgt:

$$\frac{OD_{600}}{0,2} \cdot 7,5 = x \text{ µl 2x SDS-Probenpuffer}$$

Die Proben werden für 5 bis 10 Minuten auf 95 °C erhitzt und anschließend für 1 Minute bei 14000 rpm zentrifugiert. In jede Probentasche des Gels werden 15 µl Probe gefüllt. Zur Molekulargewichtsbestimmung wird außerdem ein Proteinmarker aufgetragen. Das Gel wird in die Elektrophoresekammer eingesetzt und Anoden- sowie Kathodenpuffer eingefüllt. Die Elektrophorese wird bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA und einer Anfangsspannung von 100 V durchgeführt. Sobald die blaue Bande des Bromphenolblaus des Probenpuffers die Unterkante des Gels erreicht hat, wird die Elektrophorese beendet. Das Sammelgel wird abgetrennt und verworfen. Das Trenngel wird für 30 Minuten in Fixierlösung und anschließend für weitere 30 Minuten in Coomassie-Färbelösung geschüttelt. Zum Entfärben wird das Gel in Entfärber-Lösung gegeben bis die Proteinbanden sichtbar werden.

4.5.3 Western-Blot

Die immunologische Detektion von His-Tag-haltigen Proteinen erfolgt mit Hilfe eines Western-Blots mit den entsprechenden Antikörpern. Für den Anti-His-Tag Western-Blot wird ein primärer Antikörper, der an die His-Tag-Sequenz bindet, sowie ein sekundärer Antikörper, welcher gegen den ersten gerichtet ist und mit einer Peroxidase gekoppelt ist, eingesetzt.

Zunächst wird eine SDS-PAGE mit den entsprechenden Proben durchgeführt. Das Sammelgel wird verworfen und die im Trenngel befindlichen Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Es wird ein Sandwich aus Filterpapieren (8 cm x 6 cm) hergestellt, welche mit Puffern befeuchtet und wie folgt aufeinander gestapelt werden:

- 6 Lagen Filterpapier mit Anodenpuffer I
- 3 Lagen Filterpapier mit Anodenpuffer II
- Nitrozellulosemembran mit Anodenpuffer II
- SDS-Gel mit Kathodenpuffer
- 9 Lagen Filterpapier mit Kathodenpuffer

Das Sandwich wird in die Blotting-Apparatur eingesetzt, wobei die Nitrozellulosemembran zur Anode hin gerichtet ist. Der Blot findet bei einer Stromstärke von 2 mA/cm² für 50 Minuten statt. Um den Erfolg des Transfers auf die Membran zu überprüfen, wird das SDS-Gel mit Coomassie-Lösung gefärbt. Die Nitrozellulosemembran wird für 1 Stunde in 20 ml PBS-Blocking-Puffer geschüttelt, so dass alle freien Koordinationsstellen gesättigt sind. Es wird dreimal für 5 Minuten

mit 20 ml PBS-Tween-Puffer gewaschen. Die Membran wird für 1 Stunde mit dem Primärantikörper geschüttelt und anschließend erneut dreimal für 5 Minuten mit 20 ml PBS-Tween-Puffer gewaschen. Der Sekundärantikörper wird auf die Membran gegeben und für 45 Minuten geschüttelt. Dann wird zweimal 1 Minute mit 20 ml PBS-Tween-Puffer und zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Die Membran wird in 20 ml PBS-Puffer gegeben, 200 µl Chlornaphtol und 20 µl H₂O₂ (30 %) hinzugegeben und geschüttelt bis die Banden sichtbar sind. Abschließend wird dreimal mit 20 ml bidest. H₂O gewaschen.

4.5.4 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Zur Messung eines MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight)-Massenspektrums wird eine kleine Menge lyophilisiertes Proteinpulver mit 20 – 30 µl eines 2:1 Gemisches aus Acetonitril/Wasser und TFA (0,1 %) versetzt. Die Matrixlösung (gesättigte 2,5-Dihydroxybenzoesäure in Acetonitril/Wasser (1:2) mit 0,1 % TFA) wird in einem Verhältnis von 1:3 dazu gegeben und mittels Zentrifugation bei 5000 rpm für 10 Minuten vermischt. Anschließend wird 1 µl der Probe auf einem Metallträger (Target) aufgetragen und trocknen gelassen. Dabei kommt es zur Kokristallisation des Proteins und der Matrix. Zur Bestimmung der exakten Massen werden zusätzlich 1 – 2 µl eines Protein-Standardgemischs (Bruker Protein Calibration Standard I) zugegeben. Die in dem Gemisch enthaltenen Markerproteine erlauben eine interne Kalibrierung auf die genauen Massen der Probenmoleküle. Die Messungen wurden von Dr. Sergii Afonin (KIT Karlsruhe) an einem MALDI-TOF-Massenspektrometer der Firma Bruker durchgeführt.

4.5.5 CD-Spektroskopie

Die Präparation der CD-Proben erfolgt in Anlehnung an das für das E5-Protein im Arbeitskreis Ulrich etablierte Protokoll [52,98]. Es wird eine Stammlösung des Proteins in TFE hergestellt, wobei 1 mg Proteinpulver in 1 ml TFE aufgelöst werden. Die Konzentration dieser Stammlösung wird durch Verdünnen mit TFE so eingestellt, dass die Bande bei 195 nm im CD-Spektrum ca. 20 mdeg aufweist, was einer Proteinkonzentration von 0,3 mg/ml (~ 7 µM) entspricht. Für die Rekonstitution des Proteins in Detergenz-Mizellen bzw. Lipid-Vesikeln wird von diesen ebenfalls eine TFE bzw. TFE/H₂O-Stammlösung hergestellt. Die Probenherstellung erfolgt durch Mischen eines Aliquots der Protein-TFE-Stammlösung

(Proteinkonzentration 6 -12 μM) mit einem Aliquot der entsprechenden Detergenz- bzw. Lipid-Stammlösung in einem 2 ml Glasgefäß. Das organische Lösungsmittel wird im Stickstoffstrom entfernt. Zusätzlich werden die Proben im Vakuum getrocknet. Die Rehydratisierung erfolgt durch Zugabe von 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,8). Die Proben werden gründlich gevortext sowie 10 Minuten lang im Ultraschallbad behandelt. Die DMPC- und DPPC-Lipidproben werden zudem im Wasserbad bei 35 °C bzw. 50 °C bis zur Messung inkubiert.

Zur Aufnahme der CD-Spektren werden die Proben in eine 250 μl Quarzküvette mit 1 mm Schichtdicke gegeben. Die Messung der detergenzhaltigen Proben sowie der Lipide DEPC und POPC erfolgt bei einer Temperatur von 20 °C, die von DMPC bei 30 °C und von DPPC bei 50 °C. Die CD-Spektren werden im Bereich zwischen 260 – 180 nm in 0,1 nm Intervallen aufgenommen. Von jeder Probe werden 3 Spektren erfasst und gemittelt, wobei die Scangeschwindigkeit 10 nm/min, die response Zeit 4 s und die spektrale Bandbreite 1 nm beträgt. Weiterhin wird ein Referenzspektrum des puren Lipids bzw. Detergenzes aufgenommen und von dem Probenspektrum abgezogen. Nach Glättung der Spektren wird eine Basislinienkorrektur durchgeführt, so dass die Elliptizität bei 260 nm Null beträgt.

Die Konzentrationsbestimmung kann aufgrund der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin des PDGFR β -TM Proteins durch Messung der UV-Absorption bei 280 nm durchgeführt werden. Dazu wird ein 100 μl Aliquot der jeweiligen Probe in eine 1 cm Halbmikroküvette gegeben und ein UV-Spektrum zwischen 240 - 340 nm aufgenommen. Weiterhin wird ein Referenzspektrum ohne Protein aufgenommen und von dem Spektrum abgezogen. Anhand des Lambert-Beerschen Gesetzes kann die Proteinkonzentration berechnet werden.

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d \rightarrow c = \frac{E_{280\text{nm}}}{\varepsilon \cdot d}$$

ε : molarer Extinktionskoeffizient (für PDGFR β -TM: 6990 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), d: Schichtdicke der Küvette (1 cm), c: Proteinkonzentration (M), $E_{280\text{nm}}$: Extinktionswert bei 280 nm

Die Bestimmung der einzelnen Sekundärstrukturanteile des Proteins erfolgte durch Anwendung der Algorithmen CONTIN-LL, Selcon 3 und CDSSTR, welche auf dem DICHROWEB-Server der Universität Birbeck, London zur Verfügung stehen (siehe Kapitel 3.2) [82-86]. Für die Sekundärstrukturanalyse wurde der Referenzdatensatz SP175 verwendet.

4.5.6 OCD-Spektroskopie

Die Darstellung der Lipid-Vesikellösungen für die Messung der OCD-Spektren erfolgt analog zu der Probenherstellung der CD-Proben (Kapitel 4.5.5), wobei die Proben mit bidest. H₂O rehydratisiert werden. Ein 100-140 µl Aliquot der wässrigen Vesikel-Probe, welche zwischen 4 - 7 µg Protein enthält, wird auf ein Quarzglasfenster mit 20 mm Durchmesser aufgetragen. Der Durchmesser der aufgetragenen Probenfläche beträgt hierbei 11 mm. Für die Lipide DLPC und DMPC beträgt die Gesamtlipidmenge auf dem Glasträger 0,2 mg, für POPC und DEPC jeweils 0,05 mg. Nach dem die Probe an der Luft getrocknet ist, wird diese in die OCD-Zelle eingebaut, wo sie zunächst für ca. 15 Stunden bei 97 % Luftfeuchte (gesättigte K₂SO₄-Lösung) und einer Temperatur oberhalb des Phasenübergangs der Lipide hydratisiert wird. Die OCD-Messzelle wird in das Jasco-Spektropolarimeter eingebracht, wobei durch Rotation der Messzelle um den Lichtstrahl die Probe unter 8 verschiedenen Winkeln gemessen wird. Die Messung erfolgt für die Lipide POPC, DLPC und DEPC bei 20 °C und für DMPC bei 30 °C. Die erhaltenen Spektren werden gemittelt, wodurch spektrale Artefakte, die durch linearen Dichroismus oder Doppelbrechung zustande kommen, ausgemittelt werden. Analog zu den CD-Spektren wird ein Lipid-Referenzspektrum vom Probenspektrum abgezogen.

4.5.7 Flüssigkeits-NMR Spektroskopie

Für die Herstellung der Flüssigkeits-NMR-Proben werden 1 mM ¹⁵N- oder ¹⁵N-, ¹³C-uniform markiertes Proteinpulver in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen abgewogen und in ca. 2 ml TFE aufgelöst. Für die „Heterodimer“-Probe werden jeweils 0,85 mM unmarkiertes und ¹⁵N-, ¹³C-uniform markiertes Proteinpulver verwendet. Zum besseren Auflösen wird die Lösung 5 Minuten im Ultraschallbad sonifiziert. Es werden 200 mM DPC-d38 abgewogen und zu der Probe gegeben. Das organische Lösungsmittel wird im Stickstoffstrom abgedampft, so dass sich ein Detergenzfilm am Rand des Zentrifugenröhrchens ausbildet. Zur vollständigen Entfernung des Lösungsmittels wird die Probe über Nacht unter vermindertem Druck gehalten. Zur Rehydratisierung werden 450 µl 20 mM Natriumphosphatpuffer (pH = 6,8), welcher 100 mM NaCl enthält, verwendet. Die Probe wird bis zum vollständigen Lösen mit Ultraschall behandelt, bevor 50 µl D₂O und 2 µl 50 mM DSS-Stammlösung zugesetzt und die Probe in ein 5 mm Probenröhrchen überführt wird. Die „Heterodimer“-Probe wird in 500 µl D₂O rehydratisiert.

Die Experimente wurden an einem Bruker Avance 600 MHz Spektrometer mit einem TBI-Tripelresonanz Probenkopf durchgeführt. Zur Unterdrückung des Wassersignals wird die Einstrahlfrequenz der Protonen auf die Resonanz der Wasserlinie gesetzt. Das 3D ^{15}N -editierte NOESY- und TOCSY-Experiment wurde bei 37 °C gemessen und zur Bestimmung der ^{15}N - und ^1H -Resonanzen des Proteinerückgrats herangezogen. Die 3D Tripelresonanzexperimente (HNCA, CBCANH, CBCA(CO)NH, (H)C(CO)NH-TOCSY) wurden bei einer Temperatur von 50 °C aufgenommen und dienten der Zuordnung der ^1H -, ^{13}C - und ^{15}N -Resonanzen des Proteins [99]. Die Zuordnung der Protonenresonanzen der Seitenketten erfolgte anhand eines 3D ^{13}C -editierten NOESY-Experiments in D_2O bei einer Temperatur von 50 °C und wurde auf ein Spektrum, welches bei 35 °C gemessen wurde, übertragen. Die Messung des 3D ^{13}C -gefilterten, ^{15}N -editierten NOESY-Experiments erfolgte an einem Bruker Avance 900 MHz Spektrometer mit einem TXI-Cryo-Tripelresonanzprobenkopf bei 35 °C und diente der Bestimmung der intermolekularen NOE-Kontakte zwischen den beiden Helices des dimeren Proteins [100]. In Tabelle 4.3 ist die Anzahl der für die einzelnen Experimente verwendeten Datenpunkte sowie der spektrale Bereich aufgeführt. Die Spektren wurden auf DSS referenziert. Das Programm NMRPIPE [101] wurde zum Prozessieren der jeweiligen Spektren herangezogen wobei die Auswertung mittels NMRVIEW [102] erfolgte.

Tabelle 4.3: Heteronukleare NMR-Experimente, die an PDGFR β -TM in DPC-Mizellen durchgeführt wurden. Die t_1 - und t_2 -Zeit stellen die indirekte Dimensionen dar, während in der t_3 -Zeit die Datenakquisition erfolgte.

Experiment	Komplexe Punkte der Datenmatrix (Kern)			spektrale Breite (Hz)		
	t_1	t_2	t_3	F1	F2	F3
HNCA	64 (^{15}N)	38 (^{13}C)	1024 (^1H)	2000	5000	7183,9
HNCACB	55 (^{15}N)	45 (^{13}C)	1024 (^1H)	2000	10000	7183,9
CBCA(CO)NH	55 (^{15}N)	50 (^{13}C)	1024 (^1H)	2000	10000	7183,9
(H)C(CO)NH-TOCSY	70 (^{15}N)	60 (^{13}C)	1024 (^1H)	2000	10000	8389,2
^{15}N -NOESY	163 (^1H)	40 (^{15}N)	1024 (^1H)	6601,7	1694,9	8389,2
^{15}N -TOCSY	148 (^1H)	40 (^{15}N)	1024 (^1H)	6601,7	1694,9	8389,2
^{13}C -NOESY	200 (^1H)	75 (^{13}C)	1024 (^1H)	7501	11111	7182
^{13}C -gefiltertes, ^{13}C -editiertes NOESY	97 (^1H)	100 (^{13}C)	1024 (^1H)	5400,5	9048,8	8993

ARIA1.2-CNS [103] wurde sowohl für die Kalibrierung der NOE-Distanzen sowie zur Berechnung der Struktur des monomeren und dimeren Proteins verwendet. Zur Berechnung der Monomerstruktur wurden 480 NOEs, 68 dihedrale Winkel und 17 Wasserstoffbrückenbindungen verwendet. Hierbei wurden die intermolekularen NOE-Kontakte vernachlässigt. Daraufhin wurde die Dimerstruktur berechnet, indem zwei Monomerstrukturen unter der Einwirkung eines schwachen pseudo-Potenzials kombiniert wurden. Die NCS (non-crystallographic symmetry)-Kraftkonstante betrug hierbei 1 kcal/mol. In diesem Schritt wurden sowohl die intra- als auch die intermolekularen NOE-Kontakte berücksichtigt. Die Strukturen wurden mittels PROCHECK [104] untersucht und mit Hilfe des Visualisierungsprogramms MOLMOL [105] dargestellt.

4.5.8 Festkörper-NMR Spektroskopie

Für die Festkörper-NMR Messungen wird das Protein in mechanisch orientierten Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen oder in Bizellen rekonstituiert.

Zur Herstellung mechanisch orientierter Proben auf Glasplättchen werden jeweils 15,3 mg der Lipide DMPC und POPC abgewogen. Uniform ^{15}N -markiertes Protein wird ebenfalls als Pulver abgewogen, so dass das gewünschte Protein-zu-Lipid-Verhältnis erreicht wird. Das Proteinpulver wird in jeweils 1 - 3 ml TFE aufgelöst und die entsprechenden Lipide hinzugegeben. Nach einer fünfminütigen Inkubation im Ultraschallbad wird das organische Lösungsmittel im Stickstoffstrom abgedampft und zur vollständigen Entfernung über Nacht unter vermindertem Druck gehalten. Der Lipidfilm wird durch die Zugabe von 1360 μl bidest. H_2O gelöst, wobei sich nach der Ultraschallbehandlung kleine unilamellare Vesikel (SUV's) ausbilden, in welchen das Protein rekonstituiert ist. Die Lösung wird gleichmäßig auf 17 Glasplättchen (7,5 x 12 mm) verteilt. Nach dem Trocknen werden die Glasplättchen gestapelt, wobei ein weiteres leeres Glasplättchen als Deckel dient. Diese werden nun in einen Glascontainer (7,7 x 2,2 x 30 mm) überführt, welcher über Nacht bei 48 °C in einer verschlossenen Kammer in Anwesenheit einer gesättigten K_2SO_4 -Lösung (97 % Luftfeuchte) inkubiert wird. Hierbei wird die Probe rehydratisiert und es bilden sich orientierte Lipiddoppelschichten aus. Um die Probe vor Austrocknung zu schützen, werden in den Glascontainer auf beiden Seiten mit Wasser befeuchtete Papiertücher hinzugefügt und die Öffnungen mit Parafilm verschlossen.

Für die Herstellung von magnetisch orientierten Bizellen werden als langkettige Lipide reines DMPC oder ein Gemisch aus DMPC und DMPG (molares Verhältnis 80:20) verwendet. Als kurzkettiges Lipid wird das etherverknüpfte 6-O-PC benutzt. Der Lipidanteil beträgt 22 % bzw. 25 % (w/v) in einem molaren Verhältnis $q=3,2$ bzw. $q=5,0$ von langkettigen zu kurzkettigen Lipiden. Zur Darstellung der Proben werden die langkettigen Lipide als Pulver abgewogen und das kurzkettige 6-O-PC aufgrund seiner Hygroskopizität als Stammlösung hinzugefügt. Die Probe wird mit bidest. H_2O bis zu einem Gesamtvolumen von 256 μl ($q=3,2$) bzw. 210 μl ($q=5,0$) aufgefüllt und gevortext. Die Lipidmischung wird abwechselnd bei 0 °C und 43 °C inkubiert, bis sich eine klare Lösung gebildet hat. Nach der Einstellung des pH-Wertes von 6,8 auf Eis werden 170 μl der kalten Lösung auf das Proteinpulver gegeben. Hierbei wird die Proteinmenge so gewählt, dass sich das gewünschte Protein-zu-Lipid-Verhältnis ausbildet. Das Gemisch wird nun erneut abwechselnd bei 0 °C und 43 °C inkubiert, bis das Proteinpulver vollständig aufgelöst ist. Der pH-Wert wird erneut überprüft und die Probe in ein Probenröhrchen überführt, welches mit einem Gummistopfen luftblasenfrei verschlossen wird.

Die Messung der Festkörper-NMR Experimente erfolgte an einem Bruker 500 MHz Spektrometer mit einer Flachspule für die Messung der orientierten Proben auf Glasplättchen bzw. mit einer Solenoid-Rundspule für die Bizellen-Proben. Zur Messung der ^{31}P -NMR-Spektren wurde die 1H entkoppelte Hahn-Echo-Pulssequenz verwendet. Die Referenzierung erfolgte extern mit 85 %iger H_3PO_4 , die bei Raumtemperatur gemessen und auf 0 ppm gesetzt wurde. Die 1D- ^{15}N -Experimente wurden unter Benutzung eines Kreuzpolarisations-Pulsprogramms (CP-MOIST Pulssequenz) gemessen [106]. Die heteronukleare 1H - ^{15}N -Entkopplung wurde mittels der SPINAL-16 Pulssequenz während der Akquisition durchgeführt [107]. Um eine Aufheizung der Probe während der Messung zu vermeiden, wurde eine CP-Mischzeit von 1 ms sowie eine Wiederholzeit von 8 s zwischen den einzelnen Scans gewählt. Des weiteren wurden alle Spektren in der ^{15}N -Dimension auf 26,8 ppm für festes $^{15}NH_4SO_4$ und in der 1H -Dimension auf 4,7 ppm für H_2O referenziert. Die Visualisierung der Daten erfolgte mit Topspin (Bruker Biospin).

5. Ergebnisse

5.1 Herstellung von PDGFR β -TM

5.1.1 Klonierung des PDGFR β -TM Gens in den Expressionsvektor pMMHb

Die DNA-Sequenz, welche für das Transmembransegment zwischen der Aminosäure Histidin 494 und Glutaminsäure 531 des Rinder PDGF-Rezeptors β (kurz PDGFR β -TM) kodiert, wurde durch chemische Nukleotidsynthese hergestellt und über eine *Hind*III und *Bam*HI Restriktionsschnittstelle in den Vektor pBlueskript II KS (-) eingebracht (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland). Weiterhin enthält die DNA-Sequenz am N-Terminus zwei Basentriplets, welche für die beiden Aminosäuren Asparagin und Glycin kodieren (Abbildung 5.1). Diese Aminosäuren dienen bei der späteren Aufreinigung des Proteins als Schnittstelle, um weitere Tags chemisch abzuspalten.

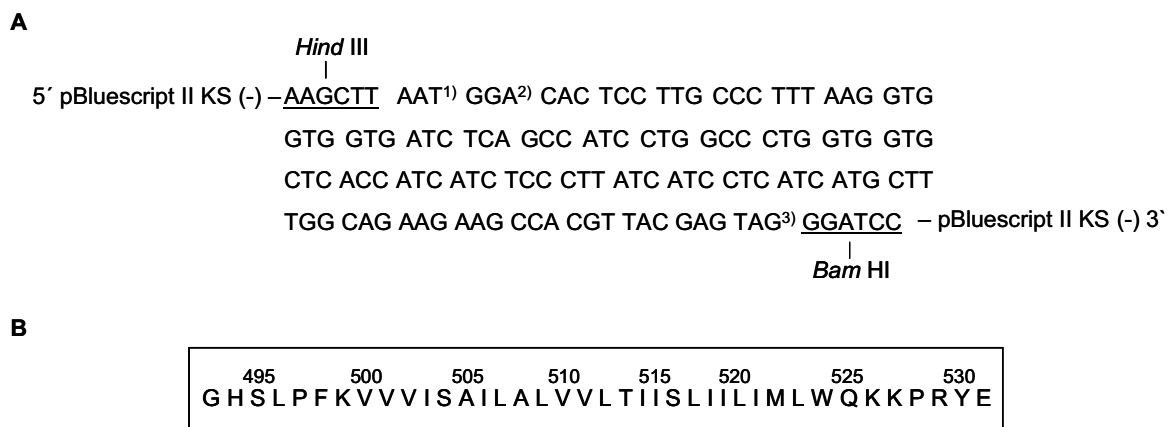


Abbildung 5.1: Nukleotidsequenz (A) und dazugehörige Aminosäuresequenz (B) des PDGFR β -TM Gens, welche den Aminosäuren Histidin 494 bis Glutaminsäure 531 des Rinder PDGF-Rezeptors β entspricht. Die DNA-Sequenz ist N-terminal über eine *Hind*III und C-terminal über eine *Bam*HI Restriktionsschnittstelle in den Vektor pBluescript II KS (-) einkloniert. 1) und 2) kodieren für die Aminosäuren Asparagin und Glycin, welche als Hydroxylamin-Schnittstelle dienen. 3) kodiert das Stop-Codon.

Für die Proteinexpression sollte die PDGFR β -TM Sequenz in den pMMHb-Vektor einkloniert werden. Dieser Vektor hatte sich bereits für die Herstellung des hydrophoben E5-Proteins im Arbeitskreis Ulrich als gut geeignet erwiesen [98]. Hierbei wird das Zielprotein als Fusionsprotein, bestehend aus einem N-terminalen His₉-Tag und einer *trp*- Δ -LE-Sequenz, exprimiert. Diese leitet sich von der Sequenz

des Tryptophan-Operons aus *E. coli* ab und ist für die Anreicherung des exprimierten Proteins in unlösliche Einschlusskörper, sogenannte Inclusion Bodies (IB), verantwortlich [108].

Um die DNA-Sequenz von PDGFR β -TM in den pMMHb-Vektor einzuklonieren, musste es zunächst aus dem pBluescript II KS (-)-Vektor isoliert werden. Dies erfolgte anhand eines Doppelverdaus mit den beiden Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Hind*III. Um kompatible Enden für die Einklonierung des PDGFR β -TM Gens in den Expressionsvektor pMMHb zu schaffen, wurde dieser ebenfalls mit den gleichen Restriktionsendonukleasen verdaut. Die verdauten DNA-Fragmente konnten mit Hilfe eines Agarosegels isoliert und aufgereinigt werden (Abbildung 5.2).

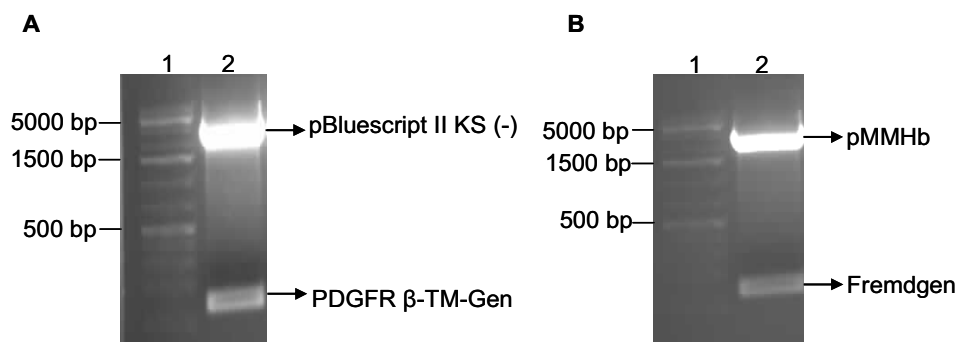


Abbildung 5.2: Doppelverdau mit *Hind*III und *Bam*HI der Plasmide pBluescript II KS (-) (A) und pMMHb (B) aufgetragen auf ein 2 % bzw. 1 % Agarosegel.

Spur 1: Marker (GeneRulerTM 1kb Plus), Spur 2: Doppelverdau von pBluescript II KS (-) bzw. pMMHb.

Der Erfolg der anschließenden Ligation des PDGFR β -TM-DNA-Fragments in den Expressionsvektor pMMHb wurde zum einen durch einen Kontrollverdau des ligierten Plasmids und zum anderen durch Sequenzierung bestätigt (Abbildung 5.3).

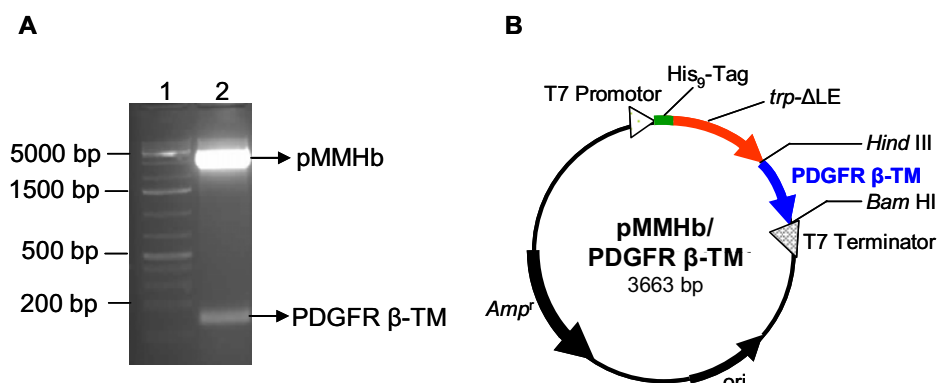


Abbildung 5.3: Kontrollverdau des in den pMMHb-Vektor einklonierten PDGFR β -TM Gens (A) sowie Vektorkarte des Fusionsproteins trp- Δ LE-PDGFR β -TM im Expressionsvektor pMMHb.

Spur 1: Marker (GeneRulerTM 1kb Plus), Spur 2: Doppelverdau von pMMHb/PDGFR β -TM.

5.1.2 Expression und Aufreinigung von PDGFR β -TM

Für die Expression wurde das Plasmid pMMHb/PDGFR β -TM in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformiert. Das PDGFR β -TM Protein wurde sowohl unmarkiert in LB-Medium als auch uniform ^{15}N - bzw. $^{15}\text{N},^{13}\text{C}$ -markiert in M9-Minimalmedium hergestellt. Hierbei enthält das Minimalmedium als einzige Stickstoff- bzw. Kohlenstoffquelle isotonenangereichertes ^{15}N -Ammoniumsulfat bzw. ^{13}C -Glukose. Die Proteinexpression erfolgte bei 37 °C im Schüttelinkubator, wobei die Kulturen bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ von ungefähr 0,6 – 0,8 wachsen gelassen wurden. Dann wurde die Proteinexpression durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Unabhängig vom Medium erreichte die Expressionsrate nach ungefähr 5 Stunden ihr Maximum. Dann beginnt aufgrund von Nährstoffmangel die Degradierung des Proteins durch das Bakterium, was anhand der immer geringer werdenden Intensität der Bande bei 17,4 kDa sowohl im SDS-Gel als auch im Western-Blot in Abbildung 5.4 ersichtlich ist. Daher wurde die Zellkultur zu diesem Zeitpunkt abzentrifugiert. Die Proteinausbeute betrug in LB-Medium ca. 3 g/L und in Minimalmedium 2 g/L.

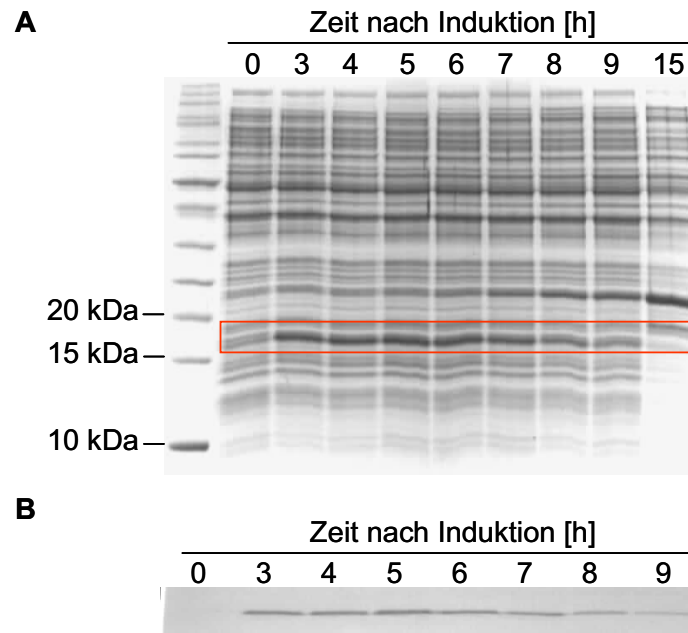


Abbildung 5.4: SDS-PAGE (A) und Western-Blot (B) der Expression von unmarkiertem PDGFR β -TM Fusionsprotein. Die Induktion erfolgte durch IPTG.

Zur Isolierung der Inclusion Bodies, welche das Fusionsprotein *trp*- Δ -LE-PDGFR β -TM enthalten, wurden die Zellen mit Ultraschall behandelt. Der Aufschluss erfolgte in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten, wobei die unlöslichen Bestandteile jeweils

durch Zentrifugation entfernt wurden. Das SDS-Gel in Abbildung 5.5 zeigt, dass sich der größte Teil des Fusionsproteins nach den Zentrifugationsschritten im jeweiligen Pellet befindet, wohingegen im Überstand kein Protein vorhanden ist. Nach der letzten Behandlung mit Ultraschall konnten die aufgelösten Inclusion Bodies mit Wasser erfolgreich ausgefällt werden.

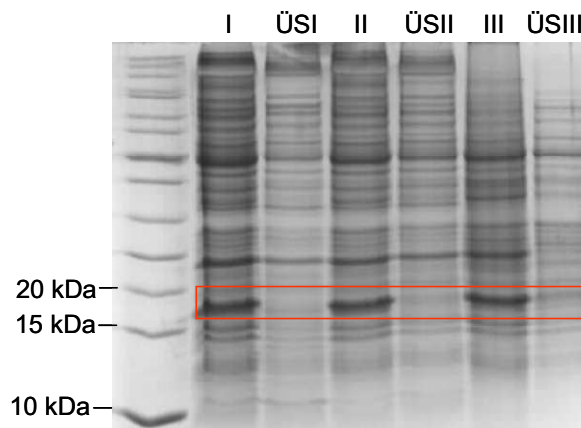


Abbildung 5.5: SDS-PAGE der Isolierung der Inclusion Bodies, welche das Fusionsprotein *trp*- Δ -LE-PDGFR β -TM enthalten. Der Aufschluss erfolgte in drei aufeinander folgenden Schritten (I-III), wobei in jedem Schritt verschiedene Aufschlusslösungen verwendet wurden. ÜS kennzeichnet den nach jedem Zentrifugationsschritt erhaltenen Überstand.

Eine weitere Aufreinigung des Fusionsproteins mittels Ni-Affinitätschromatographie erwies sich als nicht unbedingt erforderlich, da die noch vorhandenen Verunreinigungen im letzten Schritt der Aufreinigung mittels HPLC entfernt werden konnten. Somit wurden die ausgefällten Inclusion Bodies über Nacht mit Hydroxylamin verdaut, um den N-terminalen *trp*- Δ -LE-Tag mit His₉-Tag von PDGFR β -TM abzutrennen. Zwischen der Sequenz des *trp*- Δ -LE-Tags mit His₉-Tag befinden sich die beiden Aminosäuren Asparagin und Glycin, welche eine spezifische Schnittstelle für Hydroxylamin darstellen. Nach der Spaltung mit Hydroxylamin verbleibt am N-Terminus von PDGFR β -TM ein Glycin (siehe Abbildung 5.1 B), welches nicht zur nativen Sequenz gehört, aber aufgrund seiner geringen Größe die anschließenden Strukturuntersuchungen nicht weiter beeinflusst.

Um das von den Tags abgespaltene PDGFR β -TM Protein von weiteren Verdau-Produkten zu trennen, wurde die Verdau-Lösung mittels HPLC aufgereinigt. Für die Auftrennung im semipreparativen Maßstab wurden zunächst verschiedene Lösungsmittel-Zusammensetzungen, Temperaturen und Gradienten getestet, wobei die einzelnen Elutionsfraktionen mittels MALDI-TOF untersucht wurden. Ein

mehrstufiger Gradient mit unterschiedlichen Flussraten erwies sich als geeignet, um PDGFR β -TM von weiteren Spaltprodukten abzutrennen. Abbildung 5.6 zeigt das HPLC-Chromatogramm bei 220 nm, wobei das Elutionsprofil in verschiedene Abschnitte, welche dem Verlauf des Gradienten entsprechen, eingeteilt ist. Im ersten Teil des Gradienten eluieren alle Proteine, die eine geringere Hydrophobizität als PDGFR β -TM besitzen, wie nicht gespaltene Fusionsproteine, abgetrennte *trp*- Δ -LE-Proteine mit His₉-Tag sowie diverse Verunreinigungen und Salze. Im anschließenden zweiten Teil eluiert das von den Tags abgetrennte PDGFR β -TM Protein mit einer Retentionszeit von 19 – 21 Minuten in Form eines einzelnen, gut aufgetrennten Peaks. Um eventuell noch vorhandene polare Verunreinigungen zu eluieren, wurde im dritten Abschnitt des Gradienten die Konzentration an Lösungsmittel B herabgesetzt, sowie die Flussrate von 4 ml/min auf 7 ml/min erhöht.

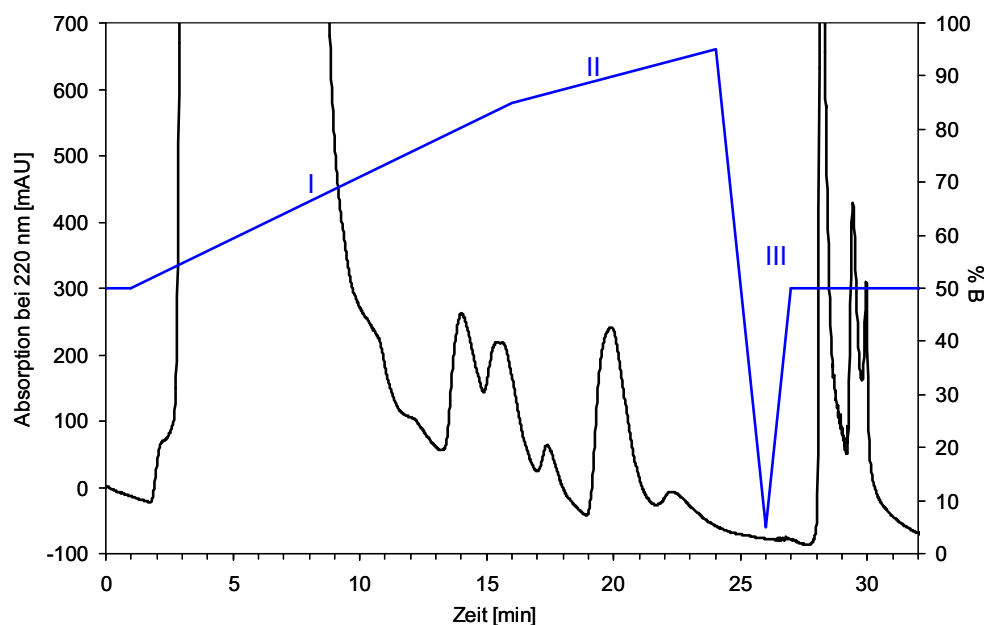


Abbildung 5.6: HPLC-Chromatogramm bei 220 nm der semipreparativen Aufreinigung des Fusionsproteins *trp*- Δ -LE-PDGFR β -TM nach dem Hydroxylamin-Verdau. Die zweite y-Achse zeigt die Volumenprozent des Lösungsmittels B. Der verwendete Gradient wird durch die blaue Linie dargestellt, wobei das gespaltene PDGFR β -TM Protein im zweiten Teil des Gradienten (II) eluiert (19 – 21 min).

Bei der Aufreinigung des sich ähnlich verhaltenden E5-Proteins im Arbeitskreis hatte sich gezeigt, dass die aufgereinigten Proteinproben immer noch Restmengen an Guanidin-Hydrochlorid beinhalten, welches während des Zellaufschlusses und Hydroxylamin-Verdaus zugesetzt wird [98]. Da Guanidin-Hydrochlorid denaturierend

wirkt und somit die Ausbildung von Wasserstoffbrücken verhindert, musste für die anschließenden Strukturuntersuchungen sichergestellt werden, dass alle Salzreste vollständig entfernt sind. Daher wurden die gesammelten HPLC-Fractionen über mehrere Tage hinweg gegen destilliertes Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert.

Die durchschnittliche Ausbeute an aufgereinigtem PDGFR β -TM Protein betrug ca. 2 mg/L in LB-Medium und 1 mg/L in Minimalmedium.

5.1.3 Charakterisierung mittels SDS-PAGE und MALDI-TOF

Nach der erfolgreichen Aufreinigung von PDGFR β -TM wurde das Protein mittels SDS-PAGE untersucht. Das SDS-Gel in Abbildung 5.7 zeigt vier gut aufgelöste Banden bei 7 kDa, 12 kDa, 14 kDa und 17 kDa, welche einem monomeren, dimeren, trimeren und tetrameren Protein entsprechen. Das anhand des Programms „PeptideMass“ (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html) ermittelte theoretische Molekulargewicht des Monomers beträgt 4416,5 Da und des Dimers 8833,0 Da, wobei die entsprechenden Banden im Gel bei etwas höheren Massen laufen. Die Banden, welche einem Trimer und Tetramer entsprechen, stimmen mit den theoretischen Massen eines Trimers von 13249,5 Da und eines Tetramers von 17666,0 Da überein (Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1: Durchschnittliches Molekulargewicht von PDGFR β -TM und der verschiedenen Oligomere.

PDGFR β -TM	theoretische Masse [Da]
Monomer	4416,5
Dimer	8833,0
Trimer	13249,5
Tetramer	17666,0

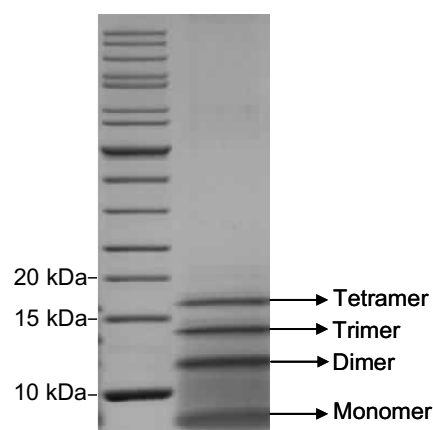


Abbildung 5.7: SDS-Gel des aufgereinigten PDGFR β -TM Proteins.

Weiterhin wurde PDGFR β -TM mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie charakterisiert. Im Vergleich zum SDS-Gel zeigt das MALDI-Massenspektrum in Abbildung 5.8 zwei Peaks bei 4416,5 Da und 8830,1 Da, welche dem monomeren und dimeren PDGFR β -TM Protein entsprechen. Höhere Oligomere konnten mittels Massenspektrometrie allerdings nicht detektiert werden. Die Tatsache, dass das nicht-kovalente Dimer sogar unter den harschen Bedingungen der Massenspektrometrie detektiert werden konnte, zeigt, dass PDGFR β -TM eine äußerst starke intrinsische Fähigkeit zur Dimerisierung besitzt.

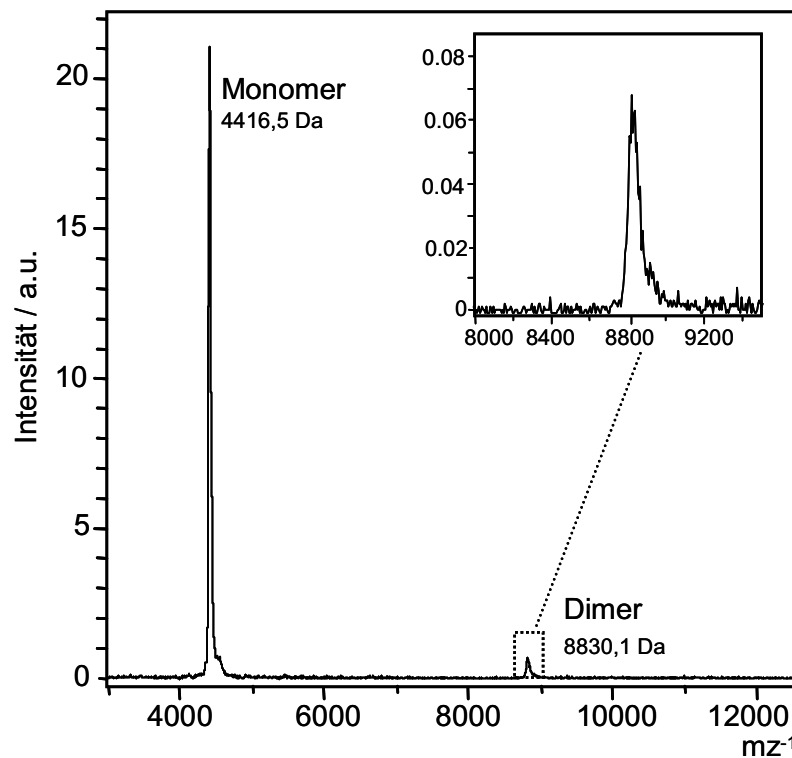


Abbildung 5.8: MALDI-TOF Massenspektrum des aufgereinigten PDGFR β -TM Proteins. Der Kasten oben rechts zeigt eine Vergrößerung des Dimer-Peaks.

5.2 Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie

5.2.1 CD an PDGFR β -TM in Detergenz-Mizellen und Lipid-Vesikeln

Zur Bestimmung der Sekundärstruktur von PDGFR β -TM wurde das Protein in verschiedenen membranimitierenden Umgebungen rekonstituiert und mittels CD-Spektroskopie untersucht.

Es wurden CD-Spektren von PDGFR β -TM in verschiedenen Detergenz-Mizellen gemessen, da diese ein gut etabliertes System für die Untersuchung von Membranproteinen darstellen. Neben dem anionischen Detergenz SDS, welches eine Kohlenwasserstoffkette von 12 C-Atomen besitzt, wurden die beiden zwitterionischen Detergenzien DPC und LPPC verwendet, deren Kohlenwasserstoffketten 12 bzw. 16 C-Atome aufweisen. Abbildung 5.9 zeigt die entsprechenden CD-Spektren, welche alle die für ein α -helikales Protein charakteristischen Banden, mit einem Maximum bei 192 nm und den beiden Minima bei 208 nm und 224 nm, aufweisen. Das Verhältnis der MRE-Intensitäten bei 192 nm und 208 nm von ca. 2:1 deutet auf einen hohen α -helikalen Anteil hin. Die CD-Spektren sind für SDS und LPPC ähnlich, wohingegen das DPC-Spektrum eine etwas geringere Signalintensität aufzeigt, was auf einen geringeren α -helikalen Anteil hindeutet.

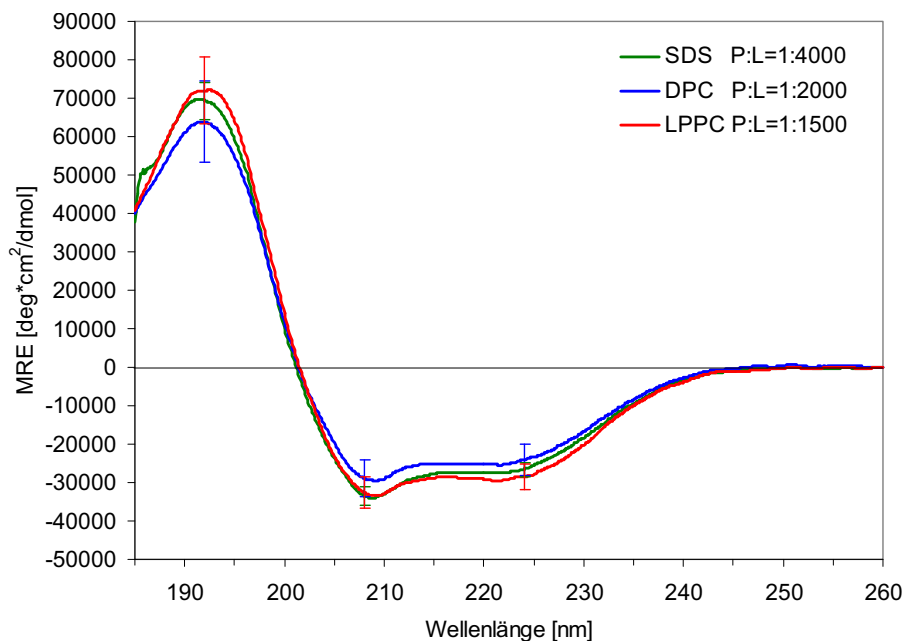


Abbildung 5.9: CD-Spektren von PDGFR β -TM in verschiedenen Detergenz-Mizellen. Die Fehlerbalken bei 192 nm, 208 nm und 224 nm zeigen die Standardabweichung der MRE-Werte aufgrund der Unsicherheit bei der Bestimmung der Proteinkonzentration.

Die quantitative Sekundärstrukturanalyse wurde mit Hilfe der drei Algorithmen CONTIN-LL, Selcon3 und CDSSTR durchgeführt (siehe Kapitel 3.2). Zusätzlich wurde der α -helikale Anteil f_H anhand einer Einzelwellenlängenauswertung bei 220 nm bestimmt. Alle drei Algorithmen lieferten recht ähnliche Ergebnisse, weswegen in Tabelle 5.2 nur die Sekundärstrukturauswertung nach CONTIN-LL und der Helixanteil gemäß der Einzelwellenlängenauswertung gezeigt ist.

Tabelle 5.2: Sekundärstrukturanalyse des PDGFR β -TM Proteins in Detergenz-Mizellen nach CONTIN-LL sowie die Bestimmung des α -helikalen Anteils f_H anhand der Einzelwellenlängenauswertung bei 220 nm.

PDGFR β -TM	α -Helix	β -Faltblatt	β -Schleife	unstrukturiert	NMRSD	f_H
SDS	82 (+9, -7) %	0%	10 (+1, -1) %	8 (+7, -8) %	0,036	81 (+6, -5) %
DPC	74 (+11, -9) %	0%	11 (+10, -2) %	15 (+6, -9) %	0,031	74 (+15, -11) %
LPPC	79 (+7, -6) %	0%	9 (+1, -2) %	12 (+5, -5) %	0,030	85 (+12, -9) %

In SDS- und LPPC-Mizellen weist PDGFR β -TM einen α -helikalen Anteil von ca. 82 % bzw. 79 % auf. In DPC-Mizellen ist der helikale Anteil leicht reduziert und beträgt ca. 74 %. Der helikale Anteil f_H , welcher anhand der Einzelwellenlängenauswertung bei 220 nm berechnet wurde, bestätigt diese Ergebnisse. Die Variation der Sekundärstrukturanteile entsteht durch die Messunsicherheit bei der Ermittlung der exakten Proteinkonzentration. Diese konnte durch Messen der UV-Absorption der aromatischen Aminosäure Tryptophan bei 280 nm bestimmt werden. Trotz der Zugabe des gleichen Aliquots an PDGFR β -TM-Stammlösung zu jeder CD-Probe konnte keine identische Proteinkonzentration für alle Proben erzielt werden, weswegen der Mittelwert der Konzentrationen für jedes entsprechende Detergenz gebildet wurde. Die Standardabweichung der ermittelten mittleren Proteinkonzentration führt zu einer Standardabweichung der errechneten MRE-Werte, welche ebenfalls symmetrisch um die mittleren MRE-Werte verteilt ist. Diese MRE-Standardabweichung wurde zu den gemittelten MRE-Werten addiert bzw. subtrahiert. Die anschließende Auswertung des dabei erhaltenen („maximalen“ bzw. „minimalen“) MRE-Spektrums mittels CONTIN-LL ergab eine asymmetrische Verteilung des Fehlers in den fraktionalen Sekundärstrukturanteilen.

Zur Beurteilung der Qualität der Sekundärstrukturauswertung wurde die normierte Standardabweichung (NMRSD) herangezogen. Für CONTIN-LL liegt der Grenzwert des NMRSD-Wertes zwischen den experimentell bestimmten und den aus den

Sekundärstrukturanteilen rekonstituierten Spektren bei 0,1. Für alle drei Detergenzien liegt der NMRSD-Wert weit unter diesem Grenzwert, was zusammen mit den für die verschiedenen Algorithmen relativ gut übereinstimmenden Ergebnissen für die Richtigkeit der Auswertung spricht.

Darüber hinaus wurde PDGFR β -TM in verschiedenen Lipid-Vesikeln untersucht, welche im Vergleich zu Mizellen ein den Gegebenheiten in natürlichen Zellmembranen näher kommendes Modellsystem für die Untersuchung von Membranproteinen darstellen. Um den Einfluss der Lipidmenge auf die Rekonstitution von PDGFR β -TM zu untersuchen, wurden CD-Spektren des Proteins in DMPC-Vesikeln unter Variation des Protein-zu-Lipid-Verhältnisses (P:L-Verhältnis) gemessen (Abbildung 5.10).

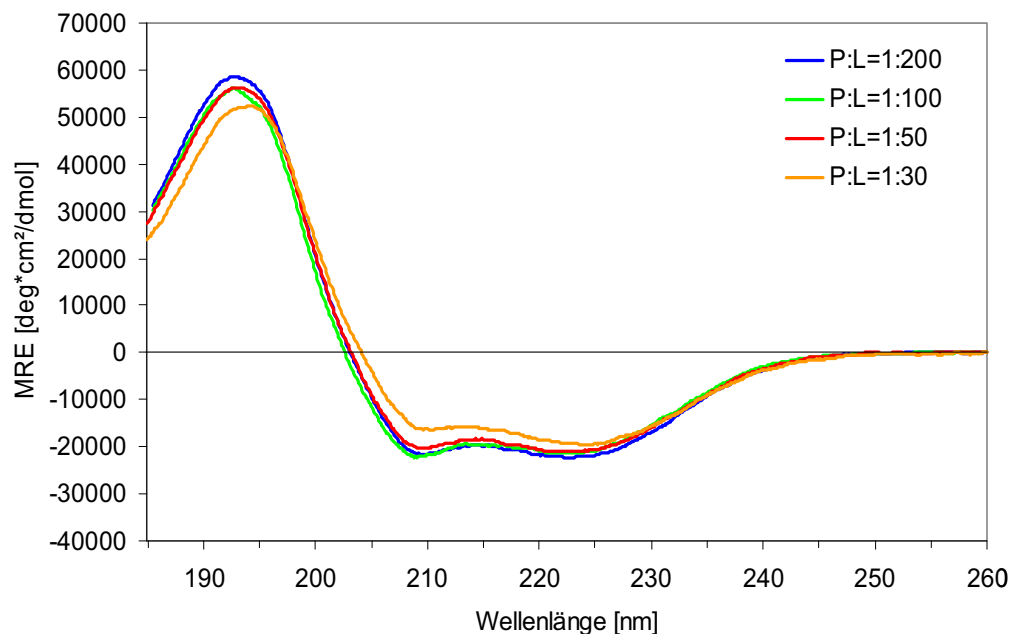


Abbildung 5.10: CD-Spektren von PDGFR β -TM in DMPC-Vesikeln unter Variation des Protein-zu-Lipid-Verhältnisses.

Wie auch die Spektren in Detergenz-Umgebung zeigen die Spektren in DMPC-Vesikeln die typischen Banden für ein α -helikales Protein. Die Spektren für die verschiedenen P:L-Verhältnisse (1:200, 1:100, 1:50) zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Linienform, mit Ausnahme des Spektrums bei einem P:L-Verhältnis von 1:30, wo eine gewisse Veränderung der Intensität und der Signalbanden auftritt. Das Maximum ist leicht zu höheren Wellenlängen verschoben und die Intensität der Bande ist reduziert, ebenso weisen die beiden Minima bei 208 nm und 224 nm geringere Signalintensitäten auf.

Dies deutet auf eine - zumindest teilweise - Aggregation des hydrophoben Proteins in den Lipid-Vesikeln hin, wodurch eine ungleichmäßige Verteilung und Abschattungseffekte der Chromophore innerhalb der Probe entstehen, welche zu einer Absorptionsabflachung im CD-Spektrum (sogenanntes *absorption flattening*) führt [109].

Zudem wurde PDGFR β -TM in POPC-, DPPC- und DEPC-Vesikeln untersucht (Abbildung 5.11), wobei für POPC und DEPC aufgrund der stark absorbierenden Doppelbindung der Acylkette und des damit verbundenen schlechteren Signal-zu-Rausch-Verhältnisses der CD-Spektren nur ein P:L-Verhältnis von 1:50 verwendet werden konnte. Sowohl das DPPC- als auch das POPC-Spektrum zeigen einen den Linienformen in DMPC ähnlichen Kurvenverlauf. Die positive Bande bei 192 nm ist für POPC leicht reduziert, wobei die beiden negativen Banden bei 208 nm und 222 nm etwas stärker ausgeprägt sind. Das DEPC-Spektrum zeigt eine leichte Verschiebung der positiven Bande bei 195 nm zu höheren Wellenlängen, die sich aber im Rahmen des Messfehlers kaum auf die prozentualen Sekundärstrukturelementanteile auswirkt und vermutlich auf geringe Absorptionsabflachungseffekte zurückzuführen ist. Die beiden negativen Banden bei 208 nm und 222 nm besitzen dagegen eine vergleichbare Intensität wie in DPPC und DMPC.

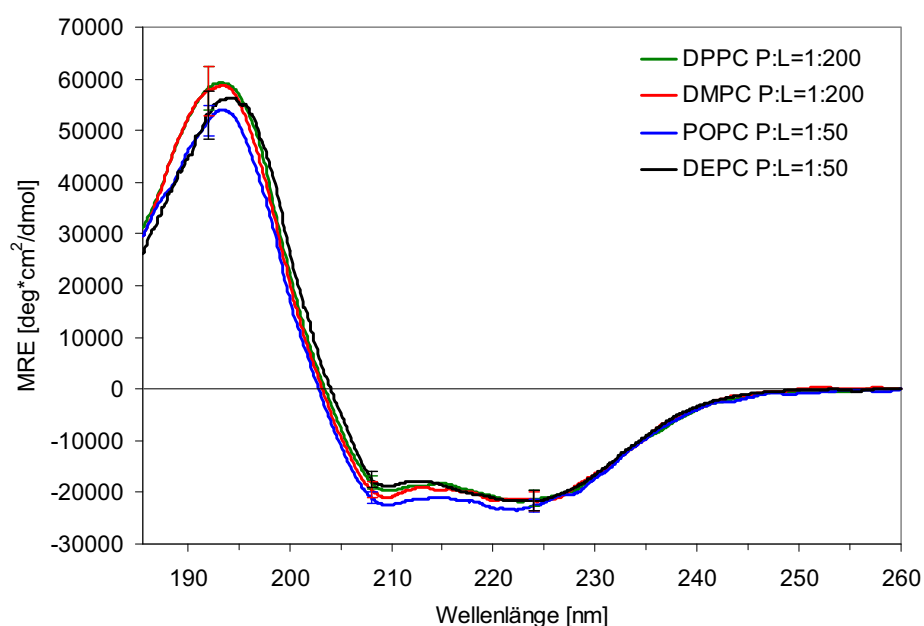


Abbildung 5.11: CD-Spektren von PDGFR β -TM in Lipid-Vesikeln aus DPPC, POPC und DEPC. Zum Vergleich ist zusätzlich auch das DMPC-Vesikel-Spektrum dargestellt. Die Fehlerbalken bei 192 nm, 208 nm und 224 nm zeigen die Standardabweichung der MRE-Werte aufgrund der Messunsicherheit bei der Bestimmung der Proteinkonzentration.

Die Sekundärstrukturauswertung wurde ebenfalls mit den Algorithmen CONTIN-LL, Selcon3 und CDSSTR sowie für den helikalen Anteil mit der Einzelwellenlängenauswertung bei 220 nm durchgeführt, die alle ähnliche Ergebnisse lieferten, was für die gute Qualität und Richtigkeit der Auswertung spricht.

Tabelle 5.3: Sekundärstrukturanalyse des PDGFR β -TM Proteins in Lipid-Vesikeln anhand des Algorithmus CONTIN-LL sowie des α -helikalen Anteils f_H anhand der Einzelwellenlängenauswertung bei 220 nm.

PDGFR β -TM	α -Helix	β -Faltblatt	β -Schleife	unstrukturiert	NMRSD	f_H
DMPC	65 (+4, -4) %	5 (+2, -1) %	11 (\pm 0) %	19 (+2, -2) %	0,049	63 (+5, -5) %
POPC	64 (+3, -3) %	4 (+2, -1) %	11 (\pm 0) %	21 (-1, +2) %	0,048	67 (+4, -4) %
DPPC	65 (+2, -4) %	5 (+2, -1) %	11 (+0, -1) %	19 (+2, -2) %	0,053	61 (+4, -5) %
DEPC	65 (+4, -4) %	7(+2, -1) %	10 (+0, -1) %	18 (+2, -2) %	0,045	62 (+5, -5) %

Nach CONTIN-LL (Tabelle 5.3) weist PDGFR β -TM in allen untersuchten Lipid-Vesikeln den gleichen α -helikalen Anteil von ca. 65 % auf. Die Ergebnisse der Einzelwellenlängenauswertung bestätigen diese Ergebnisse. Insgesamt ist somit der helikale Anteil in Lipiden etwas geringer als in Detergenzien.

5.2.2 Orientierte CD-Spektroskopie von PDGFR β -TM in Lipiddoppelschichten

Die OCD-Spektroskopie, welche auf den allgemeinen Prinzipien der CD-Spektroskopie beruht (siehe Kapitel 3.2), wurde benutzt um die Orientierung von PDGFR β -TM in Lipidmembranen zu untersuchen. Das Auftreten und die Intensität der charakteristischen „Fingerabdruck“-Bande bei ca. 208 nm ermöglicht Rückschlüsse, ob das Protein eine transmembrane oder eine parallel zur Lipiddoppelschicht verlaufende Orientierung annimmt.

Abbildung 5.12 zeigt die OCD-Spektren von PDGFR β -TM in makroskopisch orientierten DMPC-Membranen mit unterschiedlichen P:L-Verhältnissen. Die gezeigten Spektren ergaben sich aus der Mittelung von jeweils 3 – 4 Messungen. Alle OCD-Spektren weisen einen nahezu identischen Kurvenverlauf über den gesamten Wellenlängenbereich auf. Demnach nimmt PDGFR β -TM für alle untersuchten P:L-Verhältnisse die gleiche Orientierung ein. Zudem zeigen alle Spektren bei 208 nm eine von Null verschiedene, negative Bande, womit eine vollkommen senkrechte transmembrane Orientierung ausgeschlossen werden kann.

Aufgrund des Verhältnisses der beiden Minima bei 208 nm und 225 nm von ungefähr 1:2 kann davon ausgegangen werden, dass PDGFR β -TM in DMPC-Doppelschichten eine schräge Orientierung bezüglich der Membrannormalen einnimmt.

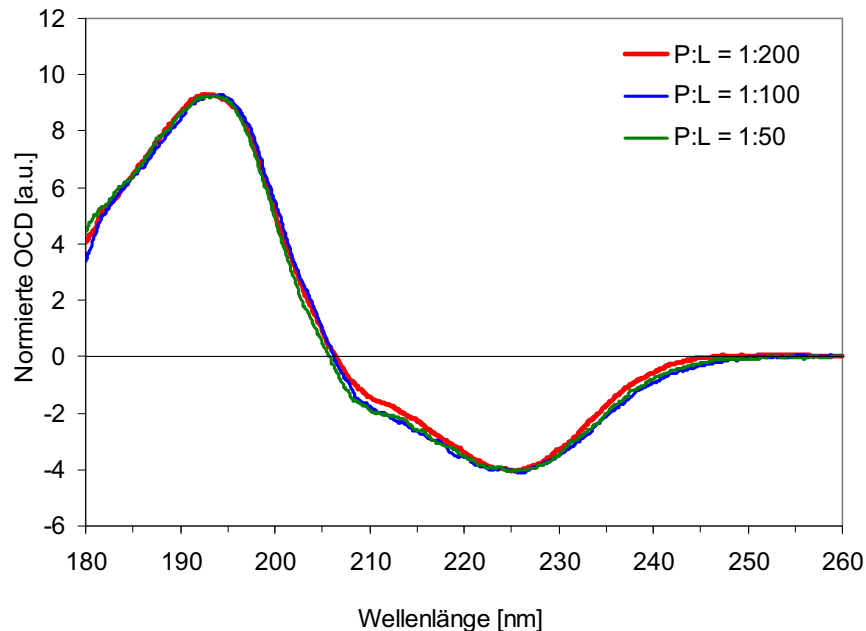


Abbildung 5.12: OCD-Spektren von PDGFR β -TM in DMPC unter Variation des Peptid-zu-Lipid-Verhältnisses. Zum besseren Vergleich wurden alle Spektren auf einen identischen Elliptizitätswert bei 225 nm normiert.

Um den Einfluss der Lipidumgebung auf die Orientierung von PDGFR β -TM zu untersuchen, wurde das Protein in verschiedenen makroskopisch orientierten Phospholipidmembranen mit unterschiedlicher Kettenlänge rekonstituiert, die allesamt in der flüssigkristallinen Phase vorliegen (Abbildung 5.13). Hierzu wurde neben DMPC (di-C14:0) das noch kürzere DLPC (di-C12:0), das etwas längere POPC (C16:0/C18:1) sowie das langkettige DEPC (di-C20:1) benutzt. Der Vergleich der OCD-Spektren in den verschiedenen Lipiden zeigt eine starke Abhängigkeit der Orientierung von der Lipid-Kettenlänge. Das OCD-Spektrum von PDGFR β -TM in orientierten DLPC-Membranen zeigt im langwelligen Bereich zwischen 210 und 260 nm einen ähnlichen Kurvenverlauf wie das in DMPC-Membranen. Allerdings ist die Intensität des DLPC-Spektrums im kurzwelligen Bereich unter 200 nm, trotz gleicher Proteinmenge deutlich reduziert. Der starke Intensitätsverlust des Spektrums lässt vermuten, dass das Protein aggregiert ist, was zur Absorptionsabflachung führt. Im Vergleich dazu zeigt PDGFR β -TM in POPC-Membranen keine Aggregation und eine signifikante Änderung in seiner Orientierung, da die charakteristische Bande bei

208 nm einen Wert nahe 0 bzw. sogar einen leicht positiven Wert annimmt. Dies zeigt, dass PDGFR β -TM in POPC-Membranen eine mehr senkrechte, transmembrane Orientierung in Bezug auf die Membrannormale annimmt. Im DEPC-Spektrum ist die negative Bande bei 208 nm vollständig verschwunden und die Linienform weist einen deutlich positiven Wert auf. Daraus lässt sich schließen, dass PDGFR β -TM in DEPC-Membranen eine nahezu vollständig senkrechte Orientierung aufweist.

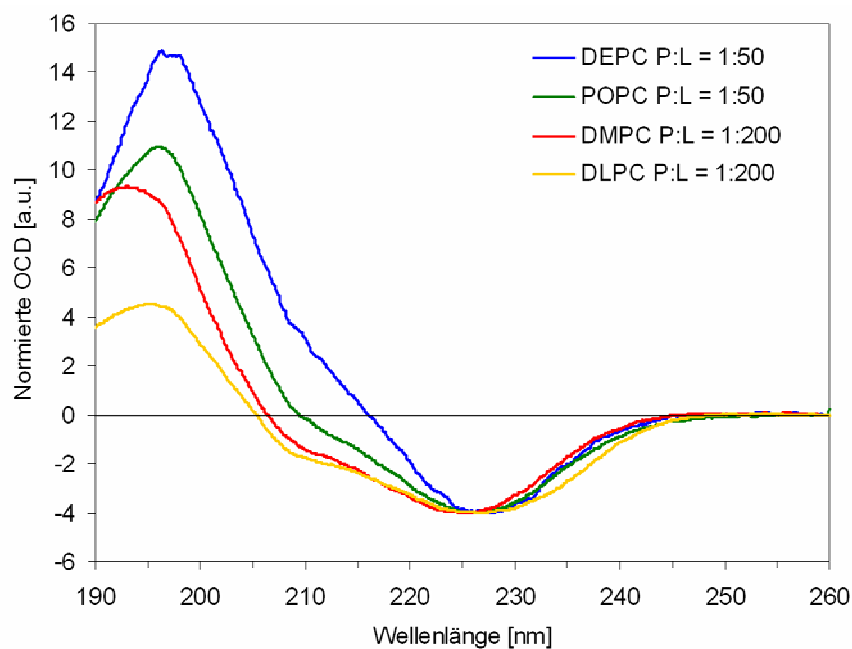


Abbildung 5.13: OCD-Spektren von PDGFR β -TM in verschiedenen Lipiddoppelschichten. Alle Spektren wurden auf einen identischen Elliptizitätswert bei ca. 225 nm normiert. Zum besseren Vergleich ist das DMPC-Spektrum mit P:L = 1:200 gezeigt.

Überdies wurde der Neigungswinkel τ , zwischen der Helixachse des in orientierten Membranen eingebetteten Proteins und der Membrannormalen, abgeschätzt. Hierfür wurde der Ordnungsparameter S_h aus dem Differenzspektrum der anisotrop orientierten OCD-Probe und dem isotropen CD-Vesikelspektrum sowie dem bekannten Ordnungsparameter des helikalen Referenzpeptids Melittin bestimmt (siehe Kapitel 3.3). Das Differenzspektrum wurde hierbei aus mehreren gemittelten OCD- bzw. CD-Spektren gebildet. Weiterhin wurde hierbei die Annahme getroffen, dass die unstrukturierten Anteile des Proteins in einer isotropen Verteilung vorliegen und somit aus dem Spektrum abgezogen werden. Infolgedessen wird nur der helikale Anteil, welcher für das Auftreten der Bande bei 210 nm verantwortlich ist, in

der Berechnung verwendet. Neben dem Differenzwert des orientierten OCD- und nicht-orientierten CD-Spektrums bei 210 nm wurde der helikale Anteil (f_H -Wert), welcher aus der Einzelwellenlängenauswertung erhalten wurde, zur Bestimmung des Ordnungsparameters verwendet. Aus dem Ordnungsparameter S_h konnte anschließend der Neigungswinkel τ von PDGFR β -TM in DMPC-, POPC- und DEPC-Membranen berechnet werden (Tabelle 5.4).

Tabelle 5.4: Übersicht über die Parameter zur Bestimmung des Neigungswinkels τ von PDGFR β -TM bezüglich der Membrannormalen in verschiedenen Lipiddoppelschichten. S_h : Ordnungsparameter, $\theta_{210}(\text{OCD-CD})$: Differenzwert aus OCD- und CD-Spektrum bei 210 nm, f_H : Helixanteil.

Lipid-doppelschicht	Anzahl Messungen	f_H	$\theta_{210}(\text{OCD-CD})$	S_h	τ
DMPC	3	0,60	16764,3	0,65	28°
POPC	4	0,62	19984,3	0,78	23°
DEPC	3	0,62	23210,7	0,91	14°

Für DLPC-Membranen konnte keine Berechnung des Neigungswinkels durchgeführt werden, da aufgrund der schlechten Rekonstitution die Qualität der Spektren nicht ausreichend war. In DMPC-Doppelschichten weist PDGFR β -TM einen Neigungswinkel von ca. 28°, in POPC-Membranen von ca. 23° und in DEPC-Membranen von ca. 14° auf. Dies bestätigt, wie anhand der OCD-Spektren schon qualitativ vermutet, dass PDGFR β -TM in DEPC-Membranen aufrechter eingebettet ist als in POPC- und DMPC-Membranen, wo die Helix stärker geneigt ist.

5.3 Flüssigkeits-NMR Spektroskopie

5.3.1 $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektroskopie

Zu Beginn der Strukturaufklärung des PDGFR β -TM Proteins mittels Flüssigkeits-NMR Spektroskopie wurden zweidimensionale $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Experimente an uniform ^{15}N -markiertem Protein aufgenommen. Sowohl die Anzahl der Signale als auch deren Form und chemische Verschiebung hängen im $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum stark von äußeren Parametern wie zum Beispiel Temperatur, pH-Wert, Salzgehalt und Detergenz ab. Das PDGFR β -TM Protein besteht aus 39 Aminosäuren. Für die Amid-Rückgrat Protonen erwartet man 36 Signale im $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum, da die beiden Proline aufgrund des fehlenden Amidprotons kein Signal ergeben und der N-Terminus wegen seiner hohen Mobilität oft nicht sichtbar ist. Weiterhin sind für die NH-Protonen der Seitenketten Glutamin und Tryptophan 3 Signale zu erwarten. Denkbar wäre auch die Detektion der Protonen der Seitenketten Histidin, Lysin und Arginin, wobei diese aber nur in manchen Fällen sichtbar sind.

Um die Qualität des $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrums zu optimieren, wurden verschiedene Bedingungen getestet. Zunächst wurde der Einfluss von Salz untersucht, wobei zwei $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Experimente von uniform ^{15}N -markiertem PDGFR β -TM Protein in DPC-Mizellen bei einer Temperatur von 37 °C vor und nach der Zugabe von 100 mM NaCl verglichen wurden (Abbildung 5.14).

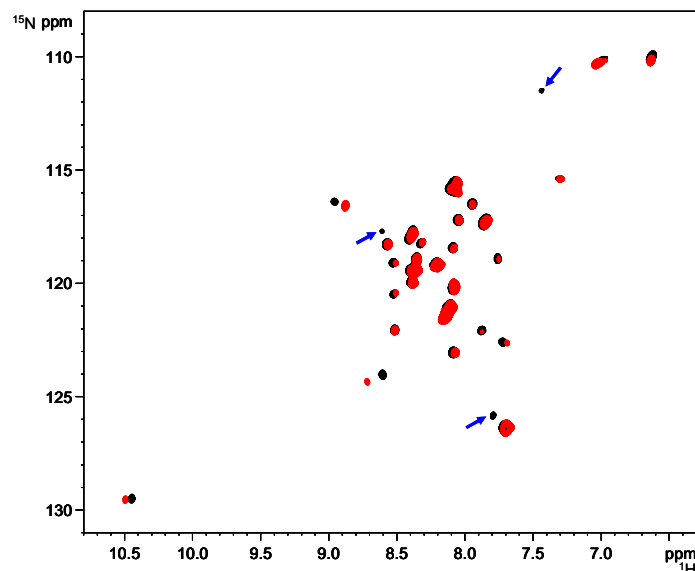


Abbildung 5.14: Überlagerung der $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von PDGFR β -TM in DPC-Mizellen und Phosphatpuffer (pH 6,8) bei einer Temperatur von 37 °C vor (rotes Spektrum) und nach (schwarzes Spektrum) der Zugabe von 100 mM NaCl. Die blauen Pfeile zeigen die zusätzlich auftretenden Signale nach der Zugabe von NaCl.

In beiden Spektren überlagern die Resonanzsignale bei nahezu gleichen Frequenzen. Allerdings zeigt das Spektrum nach der Zugabe von NaCl im Vergleich zum salzfreien Spektrum drei zusätzliche, gut aufgelöste Signale (siehe Pfeile in Abbildung 5.14). Daher wurden für alle weiteren NMR-Messungen die Proben mit 100 mM NaCl versetzt. Das ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrum weist insgesamt ca. 36 gut aufgelöste Signale auf, was der theoretischen Anzahl von 39 Signalen (36 des Rückgrats und 3 der Seitenketten) nahe kommt. Weiterhin deutet die hohe spektrale Dispersion der Signale und die scharfe Linienform auf eine gute Faltung des Proteins hin.

Des weiteren wurde der Einfluss der Temperatur untersucht. In Abbildung 5.15 sind die ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektren bei 37 °C und 50 °C dargestellt. Die Anzahl der Resonanzsignale sowie deren Linienform ist für beide Temperaturen gleich. Nur für einige wenige Signale hat sich die chemische Verschiebung bei 50 °C im Vergleich zu 37 °C in der Protonendimension um $\Delta\delta (^1\text{H}) \approx 0,5$ ppm zu niedrigerem Feld hin verschoben. Die Zuordnung der Signale hat zu einem späteren Zeitpunkt gezeigt, dass es sich bei diesen leicht verschobenen Signalen um Aminosäuren handelt, welche sich an den beiden Enden der Transmembranhelix befinden.

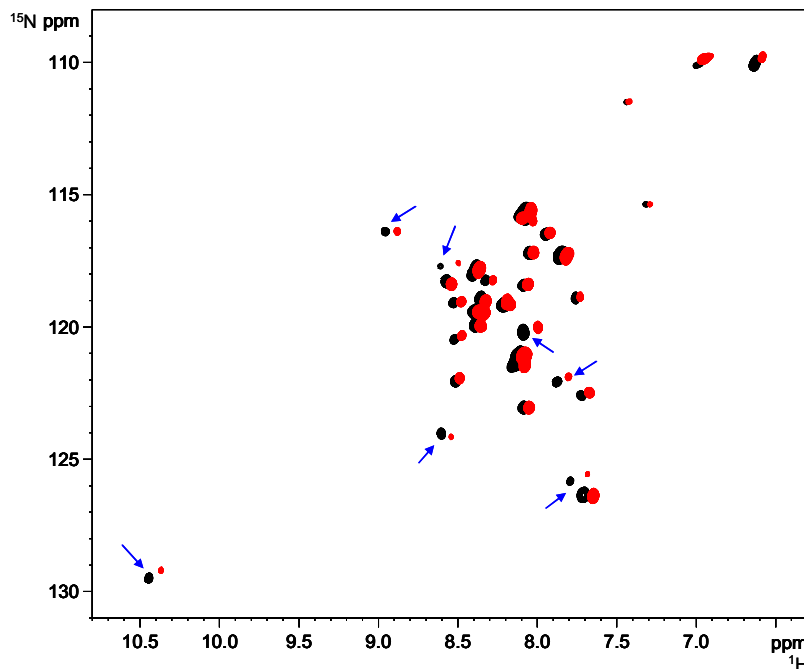


Abbildung 5.15: Überlagerung der ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektren von PDGFR β -TM in DPC-Mizellen und Phosphatpuffer (pH 6,8) bei einer Temperatur von 37 °C (rotes Spektrum) und 50 °C (schwarzes Spektrum) in Anwesenheit von 100 mM NaCl. Die blauen Pfeile zeigen die aufgrund der erhöhten Temperatur verschobenen Signale.

Zur Zuordnung der Signale des HSQC-Spektrums sind weitere Experimente notwendig, welche Informationen über den Aminosäuretyp sowie über sequentielle Konnektivitäten, das heißt Informationen über den benachbarten Aminosäurerest der signalgebenden Aminosäure, liefern.

5.3.2 Zuordnung des Proteinerückgrats von PDGFR β -TM mittels 3D

¹⁵N-editierter NOESY- und TOCSY-Experimente

Um die signalgebenden Aminosäuren im zweidimensionalen ¹H, ¹⁵N-HSQC-Spektrum genau identifizieren zu können, wurde ein dreidimensionales ¹⁵N-editiertes NOESY- und ¹⁵N-editiertes TOCSY-Experiment aufgenommen (siehe Kapitel 3.4.1.3).

Das ¹⁵N-editierte TOCSY-Spektrum wurde dazu verwendet einzelne Aminosäuretypen, welche anhand eines charakteristischen Signalmusters leicht zu erkennen sind, zu identifizieren. Die beiden Alanine 505 und 508 konnten anhand eines Kreuzsignals des H β -Protons bei δ (¹H) \approx 1,3 ppm eindeutig zugewiesen werden. Aufgrund der geringen Qualität des ¹⁵N-editierten TOCSY-Spektrums konnten außer den beiden Alaninen keine weiteren Aminosäuretypen genauer bestimmt werden. Die Gesamtgröße des Komplexes bestehend aus PDGFR β -TM und Detergenz-Mizelle führt zu einer hohen Korrelationszeit und einer schnellen Relaxation, wodurch es zu Linienverbreiterungen kommt, was letztendlich zum Intensitätsverlust der Signale führt.

Das ¹⁵N-editierte NOESY-Spektrum wurde dazu verwendet, die Verknüpfung der einzelnen Aminosäuren innerhalb der Aminosäuresequenz zu bestimmen. Hierfür wurden die in α -helikalen Bereichen charakteristischen Kontakte zwischen den Amidgruppen (H^N–H^N-Kontakte) benachbarter Aminosäuren herangezogen, die aufgrund der räumlichen Nähe der Amidgruppe einer Aminosäure zur Amidgruppe der vorherigen und nachfolgenden Aminosäure vorhanden sein sollten. Der anschließende Vergleich mit dem ¹⁵N-editierten TOCSY-Spektrum ermöglichte dann die genaue Charakterisierung der anhand der H^N–H^N-Kontakte verknüpften Aminosäuren. Zur Auswertung der dreidimensionalen Spektren wurden diese aus Gründen der Einfachheit in zweidimensionale Streifen eingeteilt. Dazu wurde für jedes entsprechende Signal in der ¹H, ¹⁵N-HSQC-Ebene die zugehörige indirekte ¹H-Dimension dargestellt. In Abbildung 5.16 ist eine zweidimensionale Streifenmatrix des ¹⁵N-NOESY-Spektrums dargestellt, welche exemplarisch die Zuordnung der Aminosäuren Valin 502 bis Valin 511 zeigt. In der H^N-Region zwischen

$\delta (^1\text{H}) \approx 7,5 - 8,5$ ppm wurde zunächst das Diagonalsignal, welches die Amidgruppe der „eigenen“ Aminosäure repräsentiert, identifiziert. Zwei Amidgruppen konnten immer dann miteinander verbunden werden, wenn in einem anderen Streifen ein Kreuzsignal bei der gleichen ^1H chemischen Verschiebung auftrat. Somit wurden immer zwei Paare von Diagonal- und Kreuzsignalen gefunden. Für einige benachbarte Aminosäuren wie beispielsweise Serin 504 und Alanin 505 sowie Leucin 507 und Alanin 508 war die Verknüpfung des Diagonal- und Kreuzsignals aufgrund der starken Signalüberlagerung erschwert.

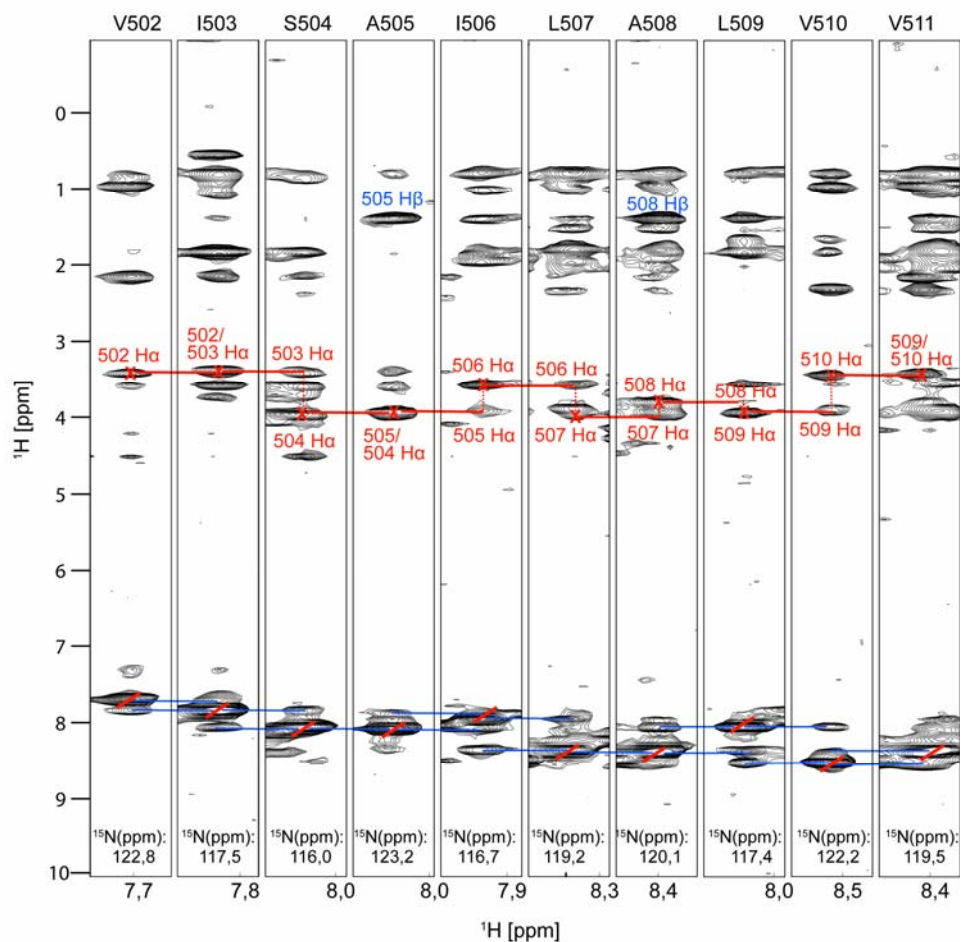


Abbildung 5.16: Zweidimensionale Streifendarstellung des ^{15}N -editierten NOESY-Spektrums der Aminosäuren Valin 502 – Valin 511 von PDGFR β -TM. Die Diagonalsignale sind mit Schrägstrichen, die interresiduellen Verbindungen zur Aminosäure (i+1) und (i-1) mit blauen Querstrichen markiert. Die Ha-Protonen der eigenen und der vorausgehenden Aminosäure sind ebenfalls gekennzeichnet, wobei die Verknüpfung zur Aminosäure (i-1) als waagrechte rote Linie dargestellt ist. (Abbildung erstellt mit dem Programm NMRVIEW [102]).

Darüber hinaus konnte der charakteristische Kontakt zwischen dem Amidproton einer Aminosäure mit ihrem „eigenen“ Ha-Proton identifiziert werden. Dieses

sogenannte H^N - $H\alpha$ -Kreuzsignal der „eigenen“ Aminosäure wurde anhand des ^{15}N -editierten TOCSY-Spektrums ermittelt und anschließend durch einfaches Vergleichen im NOESY-Spektrum bestimmt. Da jedes H^N -Proton einer Aminosäure auch das $H\alpha$ -Proton der vorangegangenen Aminosäure „sieht“, sollte in jedem Streifen neben dem eigenen H^N - $H\alpha$ -Kreuzsignal auch das von der vorangegangenen Aminosäure vorhanden sein. Somit konnte das H^N - $H\alpha$ -Kreuzsignal der vorangegangenen Aminosäure im Streifen der Aminosäure (i-1) als „eigenes“ identifiziert werden. Auf diese Weise konnten die aufgrund der H^N - H^N -Kontakte gefundenen sequenziell benachbarten Aminosäuren zusätzlich bestätigt werden. Bei einigen Aminosäuren wie Isoleucin 503, Alanin 505, und Valin 511 war das „eigene“ H^N - $H\alpha$ -Kreuzsignal mit dem der vorausgehenden Aminosäure überlagert, was die Verknüpfung benachbarter Aminosäuren anhand der H^N - $H\alpha$ -Kreuzsignale erschwerte.

Die Auswertung des ^{15}N -editierten NOESY- und TOCSY-Spektrums ermöglichte die Zuordnung der Aminosäuren Valin 501 bis Glutaminsäure 531 des PDGFR β -TM Proteins. Da die Resonanzsignale der fehlenden Aminosäuren Histidin 494 bis Valin 500 sowie des N-terminalen Glycins auch im ^{15}N -NOESY-Spektrum linienverbreitert waren, konnte für diese Reste keine Zuordnung getroffen werden.

Für einige Aminosäuren, wie beispielsweise Serin 504, Threonin 513, Isoleucin 518 und 519, war die Zuordnung allerdings unsicher. Da die Seitenkettenresonanzen aufgrund der geringen Qualität des TOCSY-Spektrums nicht zugeordnet werden konnten, reichte das alleinige NOESY-Spektrum zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur nicht aus. Daher war eine Auswertung von Tripelresonanzexperimenten für eine vollständige Zuordnung unerlässlich (siehe Kapitel 5.3.3).

5.3.3 Zuordnung der ^{13}C -Resonanzen von PDGFR β -TM mittels 3D

Tripelresonanzexperimente

Dreidimensionale Tripelresonanzexperimente (HNCA, CBCANH, CBCA(CO)NH und (H)C(CO)NH-TOCSY, siehe Kapitel 3.4.1.2) wurden an uniform ^{13}C , ^{15}N -markiertem PDGFR β -TM aufgenommen, um die bereits anhand der ^{15}N -NOESY- und TOCSY-Spektren getroffene Zuordnung zu bestätigen (Kapitel 5.3.2) bzw. die noch fehlenden Aminosäuren zuzuordnen. Weiterhin dienten diese Experimente der Ermittlung der chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome der Seitenketten, die eine

wichtige Grundlage für die Auswertung des ^{13}C -editierten NOESY-Spektrums darstellen sowie wichtige Informationen für die Strukturberechnung liefern (siehe Kapitel 5.3.4).

Im Vergleich zu den ^{15}N -NOESY- und TOCSY-Spektren können die Aminosäuren hierbei leichter identifiziert werden, da für jeden Aminosäurerest nur zwischen zwei und vier Resonanzsignale auftreten. Darüber hinaus weisen die ^{13}C -Resonanzen in diesen Spektren für jeden Aminosäuretyp ein spezifisches Signalmuster auf.

Wie bereits zuvor beschrieben, wurden die dreidimensionalen Spektren zur Erleichterung der Auswertung in zweidimensionale Streifen eingeteilt. Abbildung 5.17 zeigt exemplarisch einen Ausschnitt der sequentiellen Zuordnung der Aminosäuren Alanin 505 bis Leucin 512 anhand des CBCANH-Spektrums, welches für jede Aminosäure sowohl das „eigene“ $\text{C}\alpha$ - und $\text{C}\beta$ -Resonanzsignal als auch die der vorangegangenen Aminosäure zeigt.

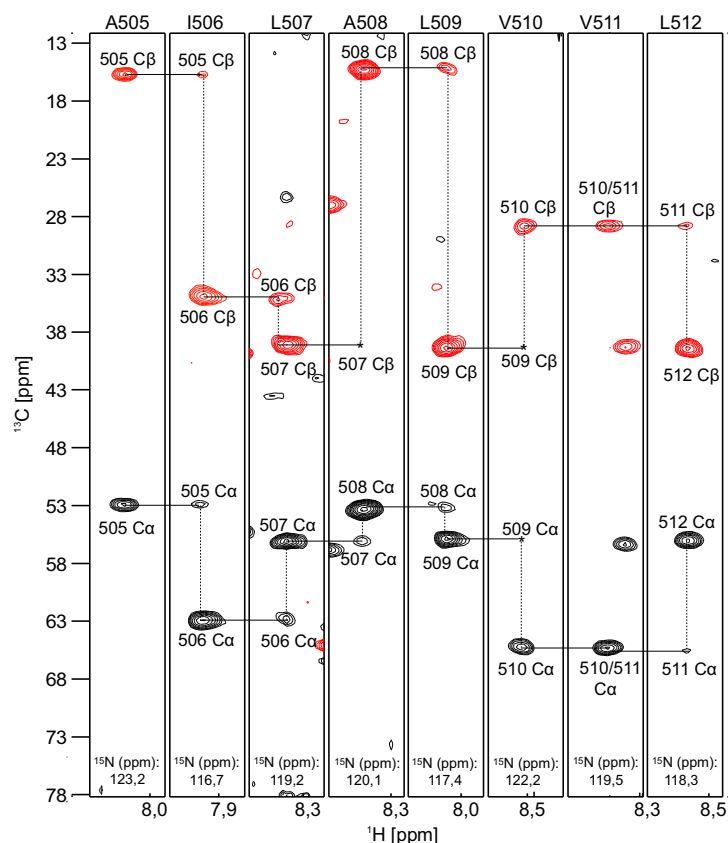


Abbildung 5.17: Zweidimensionale Streifendarstellung des dreidimensionalen CBCANH-Spektrums der Aminosäuren Alanin 505 – Leucin 512 von PDGFR β -TM. Die $\text{C}\alpha$ - und $\text{C}\beta$ -Kreuzsignale sind in schwarz bzw. rot dargestellt. Die Kreuzsignale sind mit der entsprechenden Nummer der Aminosäure gekennzeichnet. Die waagrechten Linien zeigen die Verknüpfung benachbarter Reste. Die aufgrund der geringen Intensität im CBCANH-Spektrum nicht detektierten Signale sind mit einem Stern symbolisiert. (Abbildung erstellt mit dem Programm NMRVIEW [102]).

Die Unterscheidung zwischen den $\text{C}\alpha$ - und $\text{C}\beta$ -Kreuzsignalen erfolgte zum einen anhand eines Vergleichs mit dem HNCA-Spektrum, welches nur die $\text{C}\alpha$ -Kreuzsignale der eigenen und vorausgehenden Aminosäure zeigt, sowie aufgrund ihrer um 180° verschiedenen Phasen. Weiterhin wurde das CBCA(CO)NH-Spektrum dazu herangezogen, um zwischen dem eigenen Kreuzsignal der Aminosäure i und dem des vorausgehenden Rests $i-1$ unterscheiden zu können. Dies ist durch einfaches Vergleichen mit dem CBCANH-Spektrum möglich, da im CBCA(CO)NH-Spektrum ausschließlich das $\text{C}\alpha$ - und $\text{C}\beta$ -Kreuzsignal der vorausgehenden Aminosäure detektiert wird. Wegen der zum Teil geringen Signalintensität des CBCANH-Spektrums konnten nicht immer für jede Aminosäure alle vier zu erwartenden Kreuzsignale detektiert werden. Beispielsweise zeigt der Streifen von Valin 510 nur die $\text{C}\alpha(i)$ - und $\text{C}\beta(i)$ -Kreuzsignale. Die im CBCANH-Spektrum fehlenden Resonanzen konnten jedoch anhand der anderen Tripelresonanzexperimente, welche eine stärkere Signalintensität aufzeigten, bestimmt werden.

Startpunkt für die sequentielle Zuordnung sind Aminosäuren, deren Resonanzsignale in einem Frequenzbereich auftreten, welcher sich mit dem von keiner oder nur einer Aminosäure überschneidet. Die beiden Alanine 505 und 508 konnten auf diese Weise eindeutig identifiziert werden, da das Kreuzsignal des $\text{C}\beta$ -Atoms bei $\delta(^{13}\text{C}) \approx 17,96$ ppm bzw. $\delta(^{13}\text{C}) \approx 16,95$ ppm im Vergleich zu anderen Aminosäuren stark Hochfeld verschoben ist. Die mehrfach in der Sequenz des PDGFR β -TM Proteins vorkommenden Aminosäuren Isoleucin (7x), Leucin (7x) und Valin (5x) erschwerten die Zuordnung erheblich, zumal diese Resonanzen durch die ähnliche Umgebung zusätzlich überlappten. Daher wurde das (H)C(CO)NH-TOCSY-Spektrum zu Hilfe genommen, welches auf der Frequenz von jedem Amidproton in der ^{13}C -Dimension die Kreuzsignale von allen Kohlenstoffatomen der kompletten Seitenkette des vorausgehenden Aminosäurerests zeigt. Die zweidimensionale Streifenmatrix der Zuordnung der Aminosäuren Alanin 505 bis Threonin 513 anhand des (H)C(CO)NH-TOCSY-Experiments ist in Abbildung 5.18 gezeigt.

Zur Identifikation der einzelnen Aminosäuren wurden zunächst die zum größten Teil bekannten chemischen Verschiebungen der C α - und C β -Atome herangezogen. Weiterhin wurden charakteristische Resonanzsignale wie zum Beispiel die Signaldoppelreihe bei δ (^{13}C) \approx 21 – 23 ppm der C γ -Atome von Valin oder bei δ (^{13}C) \approx 13 – 18 ppm der C γ - und C δ -Atome von Isoleucin zur eindeutigen Zuordnung verwendet.

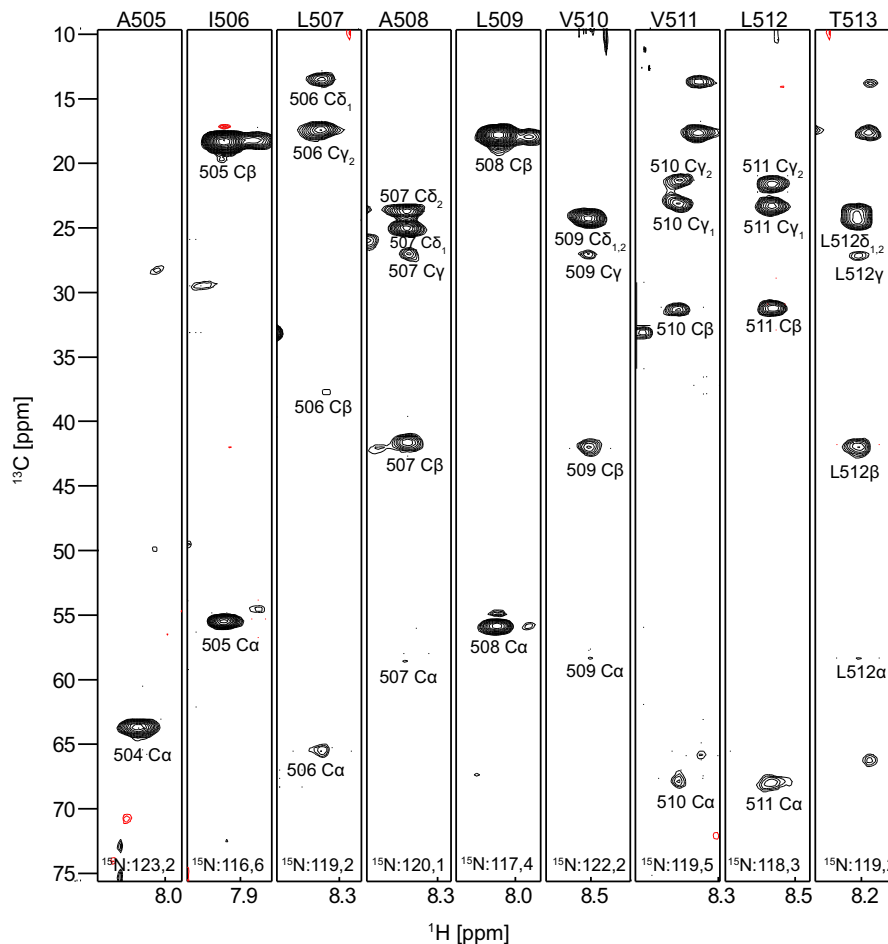


Abbildung 5.18: Zweidimensionale Streifenanordnung des dreidimensionalen (H)C(CO)NH-TOCSY-Spektrums der Aminosäuren Alanin 505 – Threonin 513 von PDGFR β -TM. Jeder Streifen zeigt die Kreuzsignale der Kohlenstoffatome der vorausgehenden Aminosäureseitenkette. Die Signale sind mit der Nummer der entsprechenden Aminosäure innerhalb der Proteinsequenz gekennzeichnet. (Abbildung erstellt mit dem Programm NMRVIEW [102]).

Mit Hilfe der Tripelresonanzexperimente konnte die Zuordnung der anhand der ^{15}N -editierten NOESY- und TOCSY-Spektren (Kapitel 5.3.2) getroffenen Aminosäuren bestätigt und alle fehlenden zugeordnet werden.

In Abbildung 5.19 ist das annotierte ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrum des PDGFR β -TM Proteins dargestellt. Von den erwarteten 36 Signalen der Amidprotonen des Proteinerückgrats wurden 32 eindeutig zugeordnet, was 89 % entspricht. Die

fehlenden Resonanzen des N-Terminus (Histidin 494, Leucin 496, Phenylalanin 498, Valin 500) sind wie bereits im vorherigen Kapitel 5.3.2 beschrieben, aufgrund ihrer Mobilität linienverbreitert und daher auch im $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum nicht detektierbar. Weiterhin ist die Seitenkette von Tryptophan 524 bei $\delta (^1\text{H}) \approx 10,5$ ppm und $\delta (^{15}\text{N}) \approx 130$ ppm sowie die von Glutamin 525 bei $\delta (^1\text{H}) \approx 6,65 - 6,95$ ppm und $\delta (^{15}\text{N}) \approx 109,5$ ppm erkennbar. Den durch die Zugabe von NaCl zusätzlich aufgetretenen Signalen (Kapitel 5.3.1) konnte keine Aminosäure zugeordnet werden. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Signalen um Artefakte einer Verunreinigung oder um Abbauprodukte des Proteins.

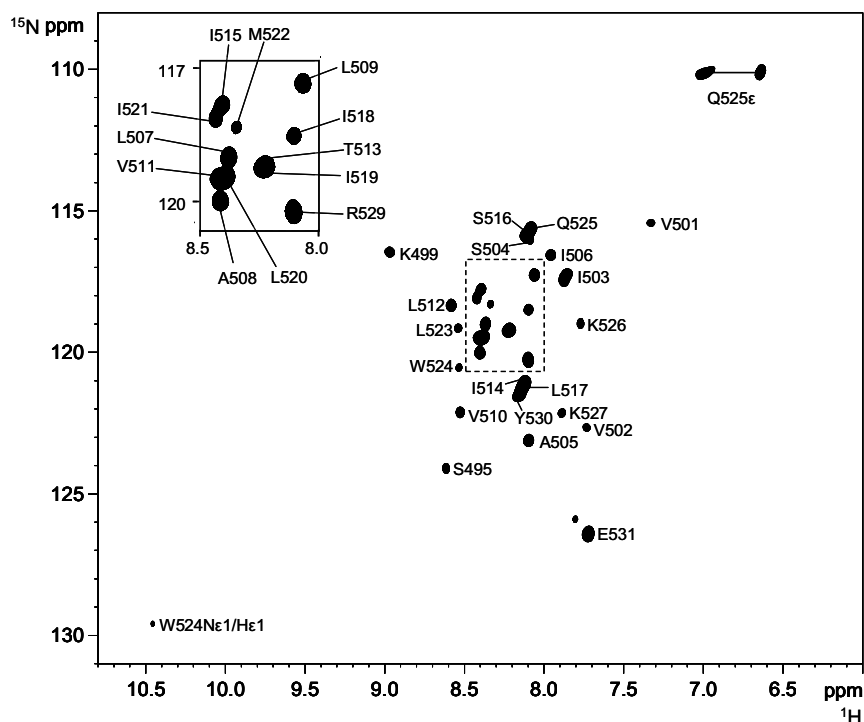


Abbildung 5.19: Annotiertes $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von PDGFR β -TM in DPC-Mizellen bei einer Temperatur von 37 °C. Die zugeordneten Signale sind mit dem Ein-Buchstaben-Symbol sowie der Nummer der entsprechenden Aminosäure innerhalb der Proteinsequenz bezeichnet. Die Signale, die sich innerhalb des Kastens befinden, sind links oben vergrößert dargestellt. Die Amidprotonen der Seitenkette von Tryptophan und Glutamin sind gesondert gekennzeichnet und für Glutamin durch eine horizontale Linie dargestellt.

Bestimmung der Sekundärstruktur: Der chemische Verschiebungsindex

Anhand der Auswertung der Tripelresonanzexperimente kann die Sekundärstrukturzusammensetzung bestimmt werden, da die chemischen Verschiebungen der C α - und C β -Atome stark von der Sekundärstruktur abhängen. Hierfür wurde die Differenz der experimentell bestimmten chemischen Verschiebungen der C α - und C β -Signale mit den Werten derselben Aminosäuren aus random-coil Regionen gebildet [110,111]. Das Säulendiagramm in Abbildung 5.20 zeigt für die Aminosäuren Phenylalanin 498 bis Tryptophan 524 positive Differenzen, was auf eine α -helikale Sekundärstruktur innerhalb dieses Bereichs deutet, welcher 27 Aminosäuren umfasst (~70 %). Die negativen Werte der Aminosäuren, die sich an den beiden Enden der PDGFR β -TM-Sequenz befinden, weisen auf einen unstrukturierten Bereich hin. Für Histidin 494 und Serin 516 sowie für das N-terminale Glycin konnte keine Auswertung getroffen werden, da für diese Reste die chemischen Verschiebungen nicht vollständig vorhanden sind.

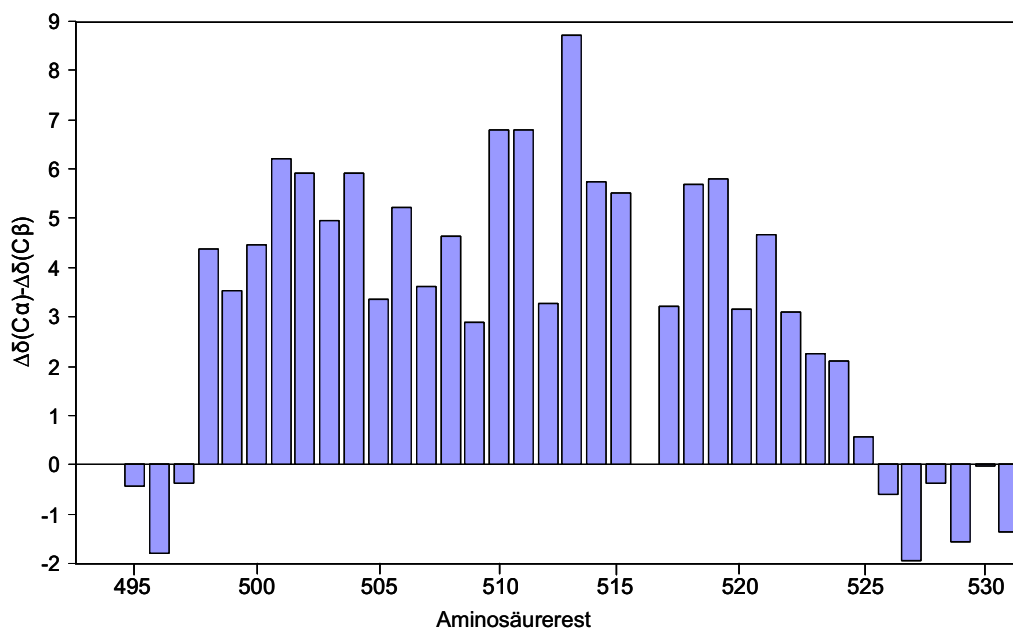


Abbildung 5.20: Chemischer Verschiebungsindex von PDGFR β -TM zur Bestimmung der Sekundärstruktur. Die positiven Werte zeigen den α -helikalen Bereich zwischen Phenylalanin 498 und Tryptophan 524.

Untersuchung der Insertion von PDGFR β -TM in die DPC-Mizelle

H₂O/D₂O-Austausch

Um Informationen über die Einbettung von PDGFR β -TM in die Detergenz-Mizelle zu gewinnen, wurde ein H₂O/D₂O-Austauschexperiment durchgeführt. Aus diesem Experiment sollten Informationen über die Ausbildung von Wasserstoffbrücken gewonnen werden, welche in der späteren Strukturrechnung berücksichtigt werden sollten (siehe Kapitel 5.3.5). Hierfür wurde die ¹³C,¹⁵N-PDGFR β -TM-Probe lyophilisiert, in 100 % D₂O wieder aufgenommen und unmittelbar danach ein ¹H,¹⁵N-HSQC-Spektrum gemessen. In diesem Experiment werden alle Amidprotonen, welche für das umgebene Lösungsmittel zugänglich sind, durch Deuteronen ausgetauscht und sind im ¹H,¹⁵N-HSQC-Spektrum nicht detektierbar.

Abbildung 5.21 zeigt eine Überlagerung der ¹H,¹⁵N-HSQC-Spektren des H₂O/D₂O-Austauschexperiments und des in wässriger Umgebung gemessenen Spektrums.

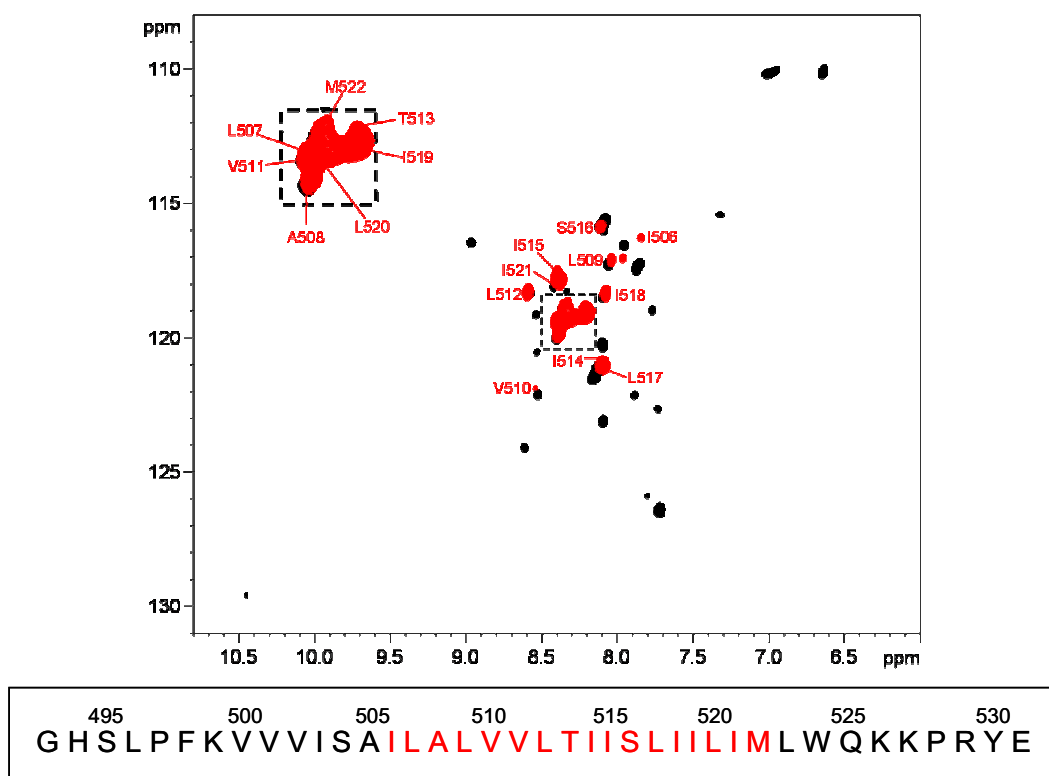


Abbildung 5.21: Überlagerung der in D₂O (rotes Spektrum) und in H₂O (schwarzes Spektrum) gemessenen ¹H,¹⁵N-HSQC-Spektren bei 50 °C bzw. 37 °C von PDGFR β -TM in DPC-Mizellen. Die in D₂O detektierten Signale sind mit dem Ein-Buchstaben-Symbol sowie der Nummer der entsprechenden Aminosäure gekennzeichnet. Die Signale, die sich im gestrichelten Kasten befinden, sind oben links vergrößert dargestellt. Weiterhin ist die Aminosäuresequenz von PDGFR β -TM aufgeführt, wobei die in D₂O detektierten Reste in rot markiert sind.

Im Vergleich zum ^1H , ^{15}N -HSQC-Experiment der Probe in H_2O , das bei einer Temperatur von 37 °C aufgenommen wurde, wurde das der D_2O -haltigen Probe bei einer Temperatur von 50 °C gemessen. Da sich gezeigt hatte, dass eine Erhöhung der Temperatur nur einen geringen Einfluss auf die Lage der Signale der meisten Resonanzen hat (siehe Abbildung 5.15), konnte davon ausgegangen werden, dass sich das Ergebnis dadurch nicht verfälschte. Nach dem $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Austausch konnten nur noch 17 Signale detektiert werden, welche den Aminosäuren Isoleucin 506 bis Methionin 522 entsprechen. Die Amidprotonen dieser übrig gebliebenen Reste sind durch die Ausbildung starker Wasserstoffbrückenbindungen beziehungsweise durch die Integration in die Detergenz-Mizelle geschützt, wobei alle anderen Hauptketten-Amidprotonen schnell gegen Deuterium ausgetauscht werden.

H_2O -NOE Kontakte im ^{15}N -editierten NOESY

Weiterhin wurde die Insertion des PDGFR β -TM Proteins in die DPC-Mizelle anhand des ^{15}N -editierten NOESY-Spektrums untersucht. Dazu wurden die charakteristischen NOE-Kontakte von den Amidprotonen zu Wasser, welche bei einer ^1H chemischen Verschiebung von $\delta (^1\text{H}) \approx 4,7$ ppm detektiert werden, verwendet. N-terminal konnte das Wasser-Signal bis Valin 502 und C-terminal bis Glutamin 525 zugewiesen werden. Das $\text{H}_{\epsilon 1}$ -Proton der Seitenkette von Tryptophan 524 zeigt jedoch schon einen Wasserkontakt, was darauf hindeutet, dass sich der aromatische Ring in der Mizellen-Wasser-Grenzschicht befindet (Abbildung 5.22). Somit sind 22 Aminosäuren des PDGFR β -TM Proteins durch die Mizelle von dem angrenzenden Wasser geschützt, was der vorhergesagten Länge der Transmembranhelix von 23 Resten anhand verschiedener Programme (SOSUI, TMHMM) sehr nahe kommt [112,113]. Im Vergleich dazu waren im $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Austauschexperiment nur 17 Aminosäuren (Isoleucin 506 bis Methionin 522) von der Mizelle vollständig geschützt. Dieser Unterschied resultiert möglicherweise daher, dass die beiden Experimente über andere Zeitskalen berichten. Die sowohl N- als auch C-terminal jeweils drei zusätzlichen Aminosäuren, die im Unterschied zum $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Austauschexperiment im ^{15}N -NOESY-Spektrum eindeutig Kontakt zum angrenzenden Wasser aufzeigen, befinden sich wahrscheinlich in einem Übergangsbereich, welcher die Grenze zwischen der Mizelle und dem umgebenden Lösungsmittel darstellt. Obwohl ein Aminosäurerest in diesem Grenzbereich im $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Austauschexperiment relativ selten Kontakt zu D_2O hat, reicht ein einziger

Austausch aus, dass kein Signal mehr detektierbar ist. Im ^{15}N -NOESY-Spektrum reicht dieser zeitlich kurze Kontakt jedoch nicht für die Ausbildung eines detektierbaren NOE-Signals aus.

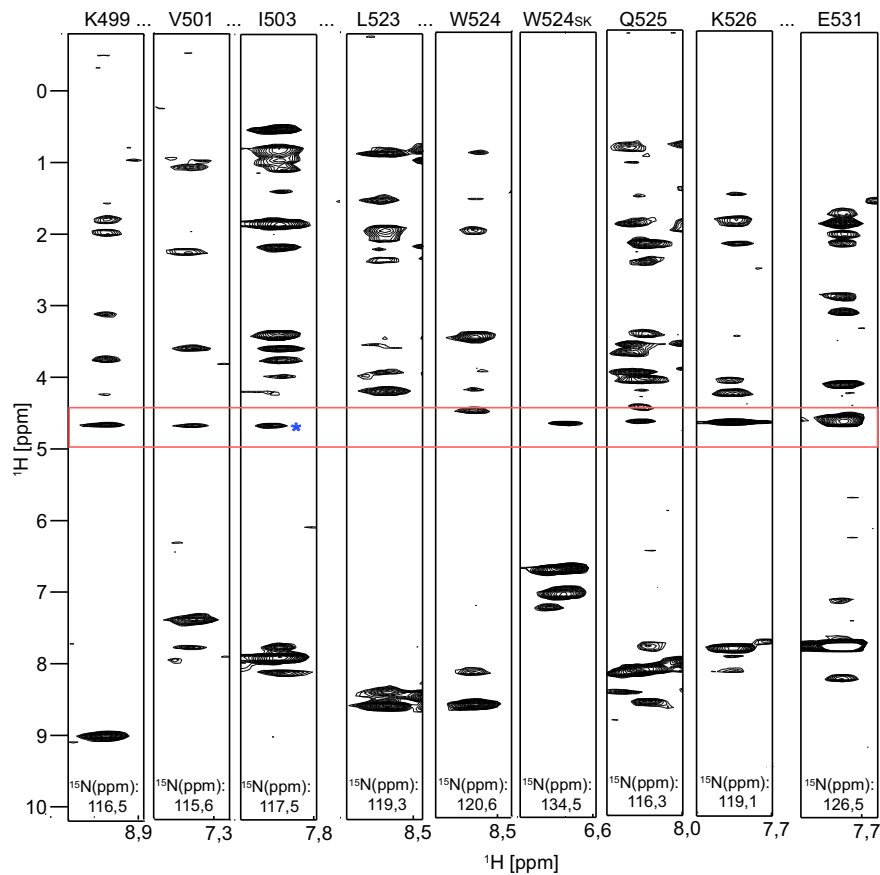


Abbildung 5.22: Zweidimensionale Streifen-NMR Darstellung ausgewählter Aminosäuren aus dem ^{15}N -editierten NOESY-Spektrum. Über den Streifen ist die dazugehörige Aminosäure mit dem Ein-Buchstaben-Symbol angegeben sowie die Seitenkette (SK) von Tryptophan. Der rote Kasten zeigt das NOE-Signal der Amidprotonen mit dem Wasser. Das Signal, welches im Streifen von Isoleucin 503 mit einem Stern markiert ist, gehört einer anderen Spur an. (Abbildung erstellt mit dem Programm NMRVIEW [102]).

5.3.4 Auswertung des 3D ^{13}C -editierten NOESY-Spektrums von PDGFR β -TM zur Gewinnung von Abstandsinformationen

Nach der erfolgreichen Zuordnung der Kohlenstoffresonanzen des Proteinerückgrats und der Seitenketten konnten nun die Resonanzen der Protonen zugeordnet werden. Hierfür wurde ein dreidimensionales ^{13}C -editiertes NOESY-Spektrum von uniform markiertem ^{13}C , ^{15}N -PDGFR β -TM in D_2O aufgenommen. Da in diesem Experiment alle an ein ^{13}C -Atom gebundenen Protonen miteinander korreliert werden, deren räumlicher Abstand kleiner 5 Å ist, besitzt das resultierende Spektrum einen sehr hohen Informationsgehalt. In Abbildung 5.23 ist exemplarisch die Zuordnung der Protonenresonanzen von Valin 502 aufgeführt. Zunächst wurde in allen ^{13}C -Ebenen von Valin 502 nach gleichen Signalmustern gesucht. Aufgrund der Zuordnung des (H)C(CO)NH-TOCSY-Spektrums (siehe Kapitel 5.3.3) war die chemische Verschiebung des $\text{C}\alpha$ -Atoms von Valin 502 bei $\delta (^{13}\text{C}\alpha) \approx 67$ ppm, des $\text{C}\beta$ -Atoms bei $\delta (^{13}\text{C}\beta) \approx 31$ ppm, des $\text{C}\gamma_1$ -Atoms bei $\delta (^{13}\text{C}\gamma_1) \approx 21$ ppm und des $\text{C}\gamma_2$ -Atoms bei $\delta (^{13}\text{C}\gamma_2) \approx 23$ ppm bekannt. Jeder Streifen in Abbildung 5.23 repräsentiert eine dieser ^{13}C -Ebenen. Anschließend wurde in den Kohlenstoffebenen, in welchen die entsprechenden Signalmuster detektiert wurden, das Diagonalsignal dem direkt gebundenen Kohlenstoffatom zugewiesen. Somit konnte in der $\text{C}\alpha$ -Ebene die chemische Verschiebung des $\text{H}\alpha$ -Signals bei $\delta (^1\text{H}\alpha) \approx 3,36$ ppm, in der $\text{C}\beta$ -Ebene das $\text{H}\beta$ -Proton bei $\delta (^1\text{H}\beta) \approx 1,82$ ppm, in der $\text{C}\gamma_1$ -Ebene das $\text{H}\gamma_1$ -Proton bei $\delta (^1\text{H}\gamma_1) \approx 0,78$ ppm und in der $\text{C}\gamma_2$ -Ebene das $\text{H}\gamma_2$ -Proton bei $\delta (^1\text{H}\gamma_2) \approx 0,50$ ppm bestimmt werden. Desweiteren konnte in der $\text{C}\alpha$ -Ebene ein Kreuzsignal bei $\delta (^1\text{H}) \approx 1,4$ ppm zwischen einem $\text{H}\beta$ -Proton eines Alanins mit dem $\text{H}\alpha$ -Proton von Valin 502 identifiziert werden. Die Analyse des chemischen Verschiebungsindex (siehe Kapitel 5.3.3, Abbildung 5.20) zeigte, dass sich Valin 502 innerhalb des α -helikalen Bereichs befindet, weswegen dieser sogenannte $\text{H}\alpha(i)\text{--H}\beta(i+3)$ Kontakt, welcher charakteristisch für eine α -Helix ist, zur genauen Bestimmung des Valin-Rests herangezogen werden konnte. Da in der Aminosäuresequenz nur zwei Alanine vorkommen, kann es sich hierbei nur um einen Kontakt zwischen Alanin 505 und Valin 502 handeln, da Alanin 508 nur mit Alanin 505 eine $(i,i+3)$ -Korrelation eingehen kann. Diese äußerst charakteristische $(i,i+3)$ -Korrelation wurde im Rahmen der Zuordnung der Protonenresonanzen auch dazu benutzt, wenn in einer gegebenen ^{13}C -Ebene mehrere mögliche Protonenresonanzen zur Verfügung standen und entschieden werden musste, um welche Aminosäure es sich genau handelte. Dies

war neben den Valinen vor allem bei den Aminosäuren Isoleucin und Leucin der Fall, die in allen Kohlenstoffebenen eine starke Signalüberlappung aufzeigten.

Auf diese Weise konnte der überwiegende Teil der Protonenresonanzen zugeordnet werden, wobei eine solche Auswertung nur bei kurzen Aminosäuresequenzen wie der von PDGFR β -TM möglich ist, da bei großen Proteinen das Problem der Signalüberlappung eine Analyse unmöglich macht.

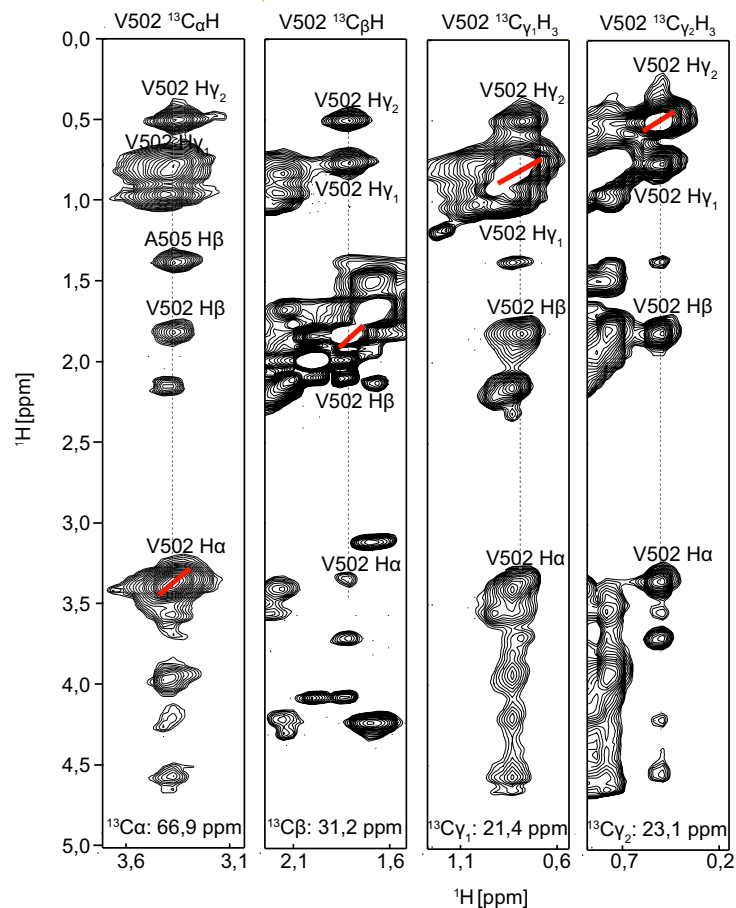


Abbildung 5.23: Zuordnung der Protonenresonanzen von Valin 502 anhand zweidimensionaler Streifen des ^{13}C -editierten NOESY-Spektrums. Jeder Streifen repräsentiert eine andere Kohlenstoffebene. Die Diagonalsignale sind mit Schrägstrichen gekennzeichnet. Im Streifen der C_α -Ebene ist zusätzlich der $\text{H}_\alpha(i) - \text{H}_\beta(i+3)$ NOE-Kontakt von Valin 502 zu Alanin 505 dargestellt. (Abbildung erstellt mit dem Programm NMRVIEW [102]).

5.3.5 Berechnung der 3D-Struktur der PDGFR β -TM Helix

Für die Umsetzung der aus den NMR-Daten gewonnenen Informationen in eine dreidimensionale Struktur wurde das Programm ARIA-CNS [103] verwendet, wobei Tabelle 5.5 eine Zusammenstellung der struktureinschränkenden Parameter für die Strukturberechnung zeigt.

Tabelle 5.5: Überblick über die Anzahl der struktureinschränkenden Parameter für die Berechnung der Monomerstruktur des PDGFR β -TM Proteins.

Anzahl experimenteller Abstandsschranken	<SA> _{ARIA}
Gesamtzahl NOE-Kontakte (eindeutig / mehrdeutig)	468 / 28
Intraresiduell ($ i-j =0$)	265 / 20
Sequentiell ($ i-j =1$)	102 / 5
Mittlere Reichweite ($1 < i-j \leq 4$)	101 / 3
Torsionswinkel ϕ ψ	68
Wasserstoffbrücken	17

<SA> ist ein Ensemble aus 20 energieminierten Strukturen. Die CNS E_{repel} -Funktion wurde zur Simulation der Van-der-Waals-Wechselwirkungen verwendet, wobei eine Energiekonstante von $25 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-4}$ benutzt wurde. Die RMSD-Werte der Bindungslängen, -winkel und der unzulässigen Torsionswinkel betragen $0,0026 (\pm 0,0001) \text{ \AA}$; $0,120 (\pm 0,001)^\circ$ und $0,194 (\pm 0,036)^\circ$; i und j bezeichnen direkt benachbarte Aminosäurereste.

Insgesamt konnten 496 NOE-Kontakte bestimmt werden, wovon 28 mehrdeutig sind. Da die Intensität eines NOE-Signals zwischen zwei Protonen umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des Abstands ist, werden die NOE-Kontakte in Abstandsgruppen, welche eine festgelegte obere und untere Grenze besitzen, eingeteilt. Grundlage für diese Einteilung sind bereits bekannte, feste Abstände aus kristallographisch bestimmten Strukturen, welche das Programm zur Kalibrierung verwendet. Weiterhin wurden die Torsionswinkel ϕ und ψ , welche die räumliche Anordnung des Proteinrückgrats definieren, in die Strukturberechnung einbezogen. Diese wurden aus den chemischen Verschiebungen der C α - und C β -Atomen anhand des Programms TALOS berechnet [114].

Überdies wurden die Wasserstoffbrückenbindungen, welche aus dem H₂O/D₂O-Austauschexperiment sowie aus den NOE-H₂O-Kontakten des ¹⁵N-editierten NOESY-Spektrums gewonnen wurden (siehe Kapitel 5.3.3), in der Strukturberechnung berücksichtigt. Insgesamt wurden 100 Strukturen berechnet, von welchen die 50 besten eine hohe Konvergenz aufweisen. Abbildung 5.24 zeigt ein Strukturbündel aus den 10 energieärmsten Strukturen.

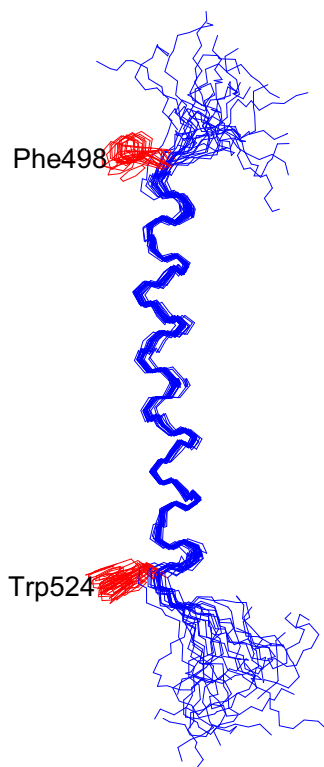


Abbildung 5.24: Strukturbündel der 10 energieärmsten Strukturen des monomeren PDGFR β -TM Proteins. Die Seitenketten der Aminosäuren Phenylalanin 498 und Tryptophan 524, welche die α -Helix beschränken, sind in rot dargestellt. Die beiden Termini sind unstrukturiert. (Abbildung erstellt mit dem Programm MOLMOL [105]).

Das monomere PDGFR β -TM Protein besteht aus einer kontinuierlichen α -Helix, welche von den Aminosäureresten Phenylalanin 498 bis Tryptophan 524 begrenzt ist. Zudem weist die Helix eine leichte Krümmung auf. Sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus ist aufgrund fehlender ¹³C-NOE-Kontakte unstrukturiert.

5.3.6 Strukturbestimmung des PDGFR β -TM Dimers

5.3.6.1 Auswertung des 3D ^{13}C -gefilterten, ^{13}C -editierten NOESY-Spektrums zur Bestimmung der intermolekularen NOE-Kontakte

Um die Struktur der in DPC-Mizellen möglicherweise vorliegenden Dimere des PDGFR β -TM Proteins mittels NMR-Spektroskopie zu bestimmen, mussten intermolekulare NOE-Kontakte zwischen zwei monomeren Molekülen eindeutig charakterisiert werden. Dazu wurde ein dreidimensionales ^{13}C -gefiltertes, ^{13}C -editiertes NOESY-Experiment an einer Probe gemessen, welche aus gleichen Teilen an uniform ^{13}C , ^{15}N -markiertem sowie aus unmarkiertem PDGFR β -TM Protein bestand (siehe Kapitel 3.4.2). Zur Auswertung wurden zunächst die einzelnen Kohlenstoffebenen mit dem bereits zugeordneten ^{13}C -editierten NOESY-Spektrum verglichen (siehe Kapitel 5.3.4), wobei Ebenen gefunden wurden, welche Resonanzsignale aufwiesen. Allerdings war eine eindeutige Zuordnung der Resonanzsignale trotz der hohen Auflösung (Messung bei 900 MHz am NMR-Zentrum Frankfurt) aufgrund der starken Degeneration der chemischen Verschiebungen für gleiche Aminosäuretypen sowohl in der Protonen- als auch in der Kohlenstoffdimension erheblich erschwert. Daher konnte zunächst nur bestimmt werden welcher Aminosäuretyp im Dimer-Interface liegt. Die genaue Überprüfung der ^{13}C chemischen Verschiebungen der intermolekularen NOE-Kontakte ergab, dass es sich bei den Aminosäuren im Interface um Alanine, Valine, Isoleucine und Leucine handelt. Nur ein einziges Signal, das von der ϵ -Methylgruppe von Methionin 522 stammte, konnte bei $\delta (^{13}\text{C}\epsilon) \approx 17,3$ ppm eindeutig zugewiesen werden, da die Aminosäuresequenz von PDGFR β -TM nur ein einziges Methionin beinhaltet. Anhand eines Strukturabgleichs wurde festgestellt, dass Methionin 522 auf derselben Seite der Helix liegt wie die beiden Alanine 505 und 508. Diese drei Aminosäuren wurden als Ausgangspunkt für die Zuordnung der weiteren Reste im Interface benutzt. Unter der Annahme, dass sich nur diejenigen Valine, Isoleucine und Leucine im Interface befinden können, die auf der gleichen Seite wie Methionin 522 und die beiden Alanine 505 und 508 liegen, konnten folgende mögliche Reste bestimmt werden: Isoleucin 515, 518, 519 und Leucin 509, 512, 520, 523 sowie Valin 500, 501, 502, 511 (Abbildung 5.25).

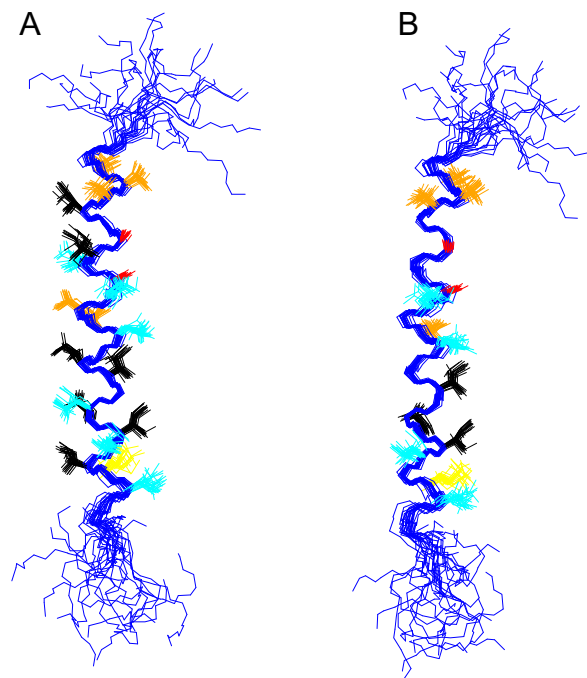


Abbildung 5.25: Mögliche Aminosäuren die das Interface des PDGFR β -TM Dimers ausbilden. In (A) sind die Seitenketten von den beiden Alaninen und Methionin sowie aller Isoleucine, Leucine und Valine aufgeführt. (B) zeigt nur diejenigen Isoleucine, Leucine und Valine, die auf der von Alanin und Methionin vorgegebenen Seite liegen. Die Seitenketten sind wie folgt markiert: Alanin: rot, Valin: orange, Leucin: hellblau, Isoleucin: schwarz, Methionin: gelb. (Abbildung erstellt mit dem Programm MOLMOL [105]).

Für die Bestimmung der genauen Aminosäurereste im Interface wurde ebenfalls das Programm ARIA-CNS verwendet. Am Anfang wurden alle auf diese Weise ausgewählten möglichen Aminosäuren für die Strukturberechnung benutzt. Die Verwendung mehrdeutiger Abstandsschranken erlaubte dem Programm geeignete im Interface liegende Aminosäuren selbst auszuwählen. Dies ergab jedoch Strukturen, die eine große Variabilität aufzeigten, anstatt zu einer einheitlichen zu konvergieren. Daher wurde in einem iterativen Prozess alle möglichen Reste im Interface von Hand variiert, sowie verschieden stark gewichtet. Anschließend wurde durch optische Analyse überprüft, ob die Symmetrie der Helix erhalten bleibt und sich das Molekül nicht in sich verdrillt hat. Die ersten Berechnungen zeigten hierbei bereits eine gewisse Präferenz für bestimmte Aminosäuren. Beispielsweise zeigte sich, dass Valin 500 und 502 nicht innerhalb des Interfaces liegen, da bei diesen Strukturen die beiden Monomere stark in sich verdrillt waren. Für die Bestimmung, welche der drei möglichen Isoleucine im Interface liegen, wurden diese sowohl einzeln als auch kombiniert als mögliche Reste dem Programm vorgegeben. Die

Strukturen, in welchen sich Isoleucin 518 im Interface befand, waren jedoch in Bezug auf die beiden Monomere nicht symmetrisch, wohingegen die Symmetrie erhalten blieb, wenn sich dagegen Isoleucin 515 und 519 im Interface befanden. Nach über 20 solcher Rechnungen konnten letztendlich Valin 501, Alanin 505, Alanin 508, Valin 511, Leucin 512, Isoleucin 515, Isoleucin 519 und Methionin 522 eindeutig im Interface zugeordnet werden. Abbildung 5.26 zeigt die Streifendarstellung der zugeordneten intermolekularen NOE-Signale.

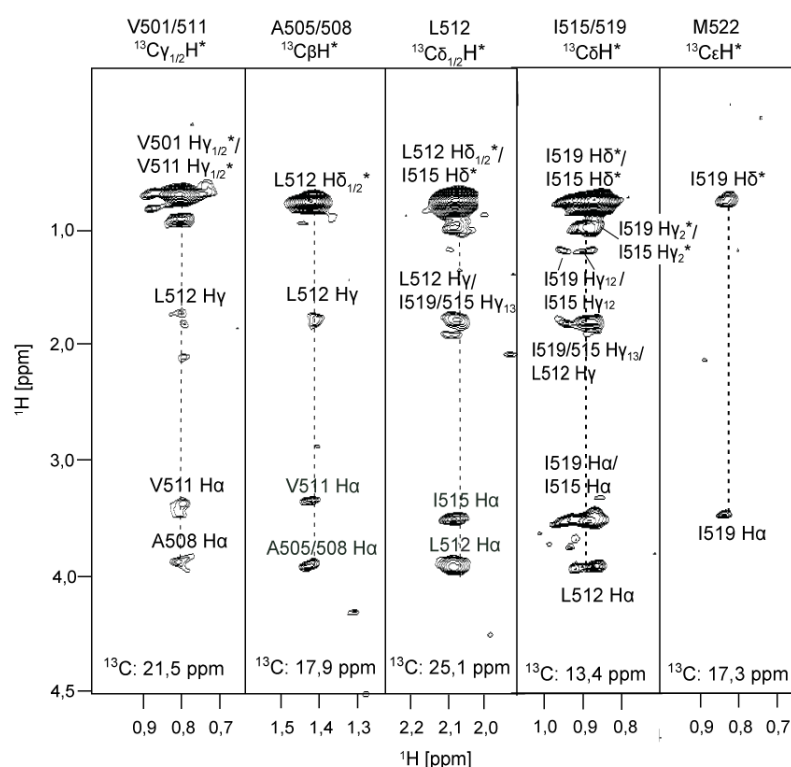


Abbildung 5.26: Zweidimensionale Streifendarstellung des ^{13}C -gefilterten, ^{13}C -editierten NOESY-Experiments zur Bestimmung der intermolekularen NOE-Kontakte zwischen den beiden symmetrischen Helices des PDGFR β -TM Proteins. Die degenerierten Protonen sind mit einem Stern gekennzeichnet. (Abbildung erstellt mit dem Programm NMRVIEW [102]).

5.3.6.2 Berechnung der 3D-Dimerstruktur von PDGFR β -TM

Die Zuordnung der intermolekularen NOE-Kontakte des ^{13}C -gefilterten, ^{13}C -editierten NOESY-Spektrums (siehe Kapitel 5.3.6.1) erlaubte die Berechnung der dreidimensionalen Dimerstruktur des PDGFR β -TM Proteins. Diese wurde ebenfalls mit Hilfe des Programms ARIA-CNS durchgeführt. Wie aus Tabelle 5.6 zu entnehmen ist, wurden für die Berechnung der Dimerstruktur die gleichen struktureinschränkenden Parameter wie für die Monomerstruktur verwendet, wobei diese um 46 intermolekulare NOE-Kontakte erweitert wurden.

Im Anhang ist eine Liste aufgeführt, welche die für die Strukturrechnung verwendeten intermolekularen NOE-Kontakte zeigt.

Tabelle 5.6: Überblick über die Anzahl der struktureinschränkenden Parameter für die Berechnung der Dimerstruktur des PDGFR β -TM Proteins sowie Kriterien für die Beurteilung der Qualität der Struktur.

A) Anzahl experimenteller Abstandsschranken	<SA>_{ARIA}^a
Monomer:	
Gesamtzahl NOE-Kontakte (eindeutig / mehrdeutig)	468 / 28
Intraresiduell ($ i-j =0$)	265 / 20
Sequentiell ($ i-j =1$)	102 / 5
Mittlere Reichweite ($1 < i-j \leq 4$)	101 / 3
Torsionswinkel ϕ ψ	68
Wasserstoffbrücken	17
Inter-Monomer	6 / 40
B) RMSD (Å) der experimentellen Abstandsschranken^b	
Alle Abstandsschranken	0,037 \pm 0,006
Torsionswinkel ^c	0,19 \pm 0,04
C) Koordinatenpräzession (Å)^d	
N, C α , C (Pro497 – Lys526)	0,33 \pm 0,03
Alle Schweratome (Pro497 – Lys526)	0,67 \pm 0,08
D) Qualität der Struktur^e	
Schlechte Kontakte	0,3 \pm 0,4
Ramachandran Plot (%):	
Meist bevorzugte Region	95,4 \pm 2,0
Weiterhin erlaubte Region	3,6 \pm 1,8
Großzügig erlaubte Region	0,6 \pm 0,9
Nicht erlaubte Region	0,5 \pm 0,7

^a<SA> ist ein Ensemble aus 20 energieminierten Strukturen. Die CNS E_{repel}-Funktion wurde zur Simulation der Van-der-Waals-Wechselwirkungen verwendet, wobei eine Energiekonstante von 25 kcal*mol⁻¹*Å⁻⁴, benutzt wurde. Die RMSD-Werte der Bindungslängen, -winkel und der unzulässigen Torsionswinkel betragen 0,0026 (\pm 0,0001) Å; 0,120 (\pm 0,001) ° und 0,194 (\pm 0,036) °; i und j bezeichnen direkt benachbarte Aminosäurereste. ^bDie distanzeinschränkenden Parameter wurden mit einem Kastenpotenzial (Energiekonstante 50 kcal*mol⁻¹*Å⁻²) berechnet. Keine Abstandsgrenze der <SA> wurde um mehr als 0,2 Å verletzt. ^cAbstandsschranken der Torsionswinkel, welche mittels TALOS berechnet wurden, wurden auf die Rückgratwinkel ϕ und ψ angewandt (Energiekonstante: 200 kcal*mol⁻¹*rad⁻²). ^dDie Koordinatenpräzession wurde anhand der RMSD-Werte der kartesischen Koordinaten der 20 energieminierten Strukturen des Ensembles in Bezug auf die mittlere Struktur zwischen Aminosäure 494 – 431 bestimmt. ^eDie Qualität der Struktur wurde mittels des Programms PROCHECK bestimmt [104].

Die besten 20 der insgesamt 100 berechneten Strukturen weisen eine hohe Konvergenz auf, was an den kleinen RMSD-Werten von 0,037 Å für alle NOE-Distanzen sowie 0,19 Å für die Torsionswinkel ersichtlich ist. Weiterhin zeugen die entsprechenden Ramachandran-Werte von einer guten Qualität der Dimerstruktur, da über 95 % der Reste in einem bevorzugten Bereich liegen. Die Dimerstruktur zeigt, dass PDGFR β -TM eine linksgängige Leucin-Zipper ähnliche Struktur ausbildet (Abbildung 5.27).

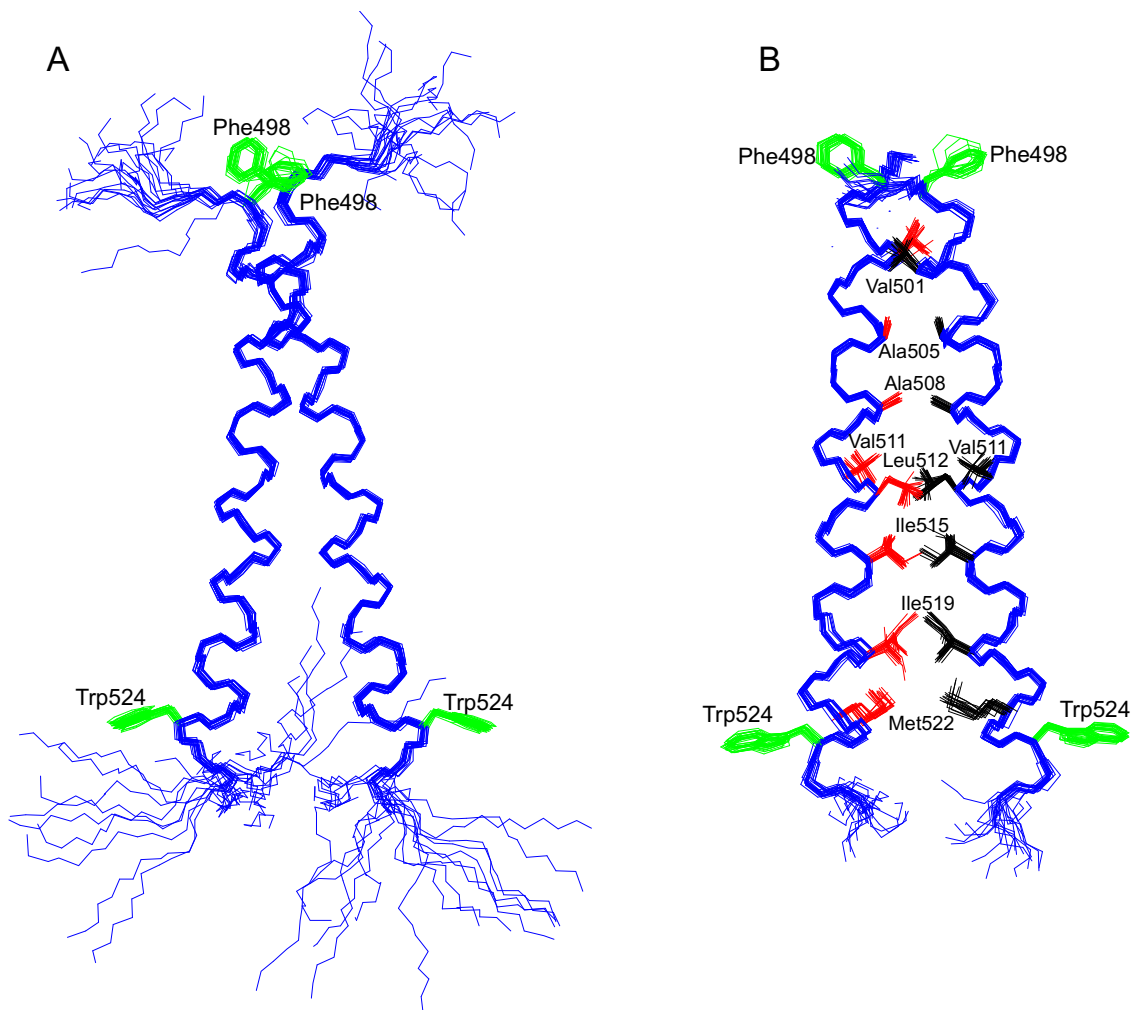
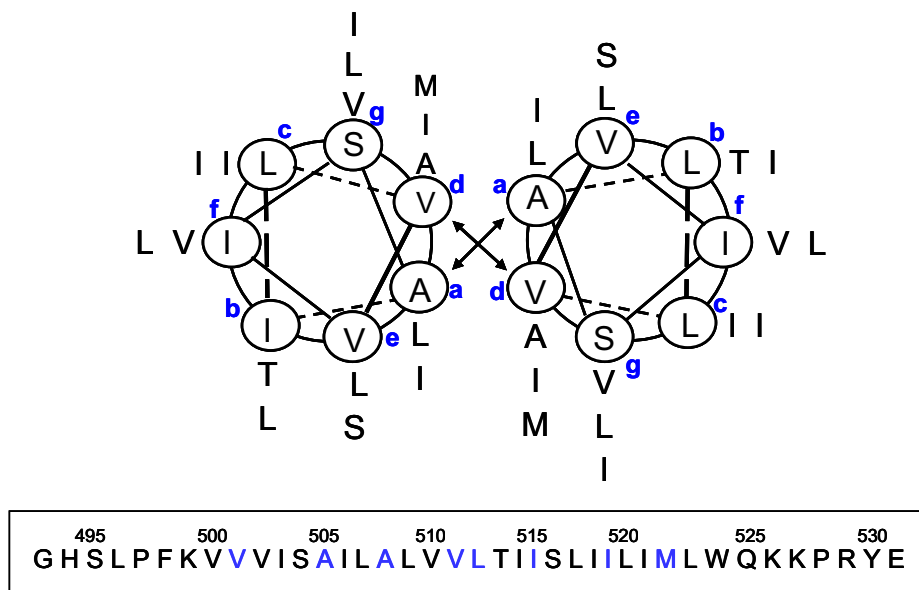


Abbildung 5.27: Strukturbündel der 20 energieärmsten Strukturen des dimeren PDGFR β -TM Proteins. In (A) ist die komplette Dimerstruktur dargestellt, (B) zeigt die detaillierte Struktur des Interface, wobei die beiden unstrukturierten Termini entfernt sind. Die Reste, welche das Dimer-Interface ausbilden sind in rot und schwarz dargestellt. Die Seitenketten von Phenylalanin 498 und Tryptophan 524 sind zur Orientierung in grün gekennzeichnet. (Abbildung erstellt mit dem Programm MOLMOL [105]).



Die beiden Helices des Dimers sind um etwa 20° zueinander geneigt. Innerhalb des C-terminalen Bereichs des Dimers weisen die beiden monomeren Untereinheiten einen engen Kontakt zueinander auf, wohingegen die beiden Alanine 505 und 508 zu einer mehr aufgeweiteten Struktur im N-terminalen Teil beitragen. Das Vorhandensein eines einzigen Signaldatensatzes für die zentralen Reste innerhalb der Transmembranhelix zeigt weiterhin, dass es sich um einen symmetrischen Dimer handelt.

5.4 Festkörper-NMR Spektroskopie

5.4.1 Optimierung der Probenherstellung zur Untersuchung von PDGFR β -TM in orientierten Modellmembranen

Nach der Strukturbestimmung von PDGFR β -TM in DPC-Mizellen sollte das Protein mittels Festkörper-NMR in einer Lipidumgebung untersucht werden, um die Orientierung des Proteins in der Membran genauer zu bestimmen als mittels OCD.

Für die Messungen mussten die optimalen Bedingungen für die Herstellung orientierter Proben bestimmt werden. Dazu wurde PDGFR β -TM in mechanisch orientierten Phospholipiddoppelschichten auf Glasplättchen rekonstituiert. Da die Ergebnisse der OCD-Messungen ergaben, dass für die Rekonstitution des PDGFR β -TM Proteins in orientierten Membranen die Phospholipide DMPC und POPC genutzt werden können (siehe Kapitel 5.2.2), wurden diese auch für die Festkörper-NMR verwendet. In Abbildung 5.29 sind die entsprechenden ^{31}P -Spektren von orientierten DMPC- und POPC-Membranen, in welchen das PDGFR β -TM Protein rekonstituiert ist, dargestellt.

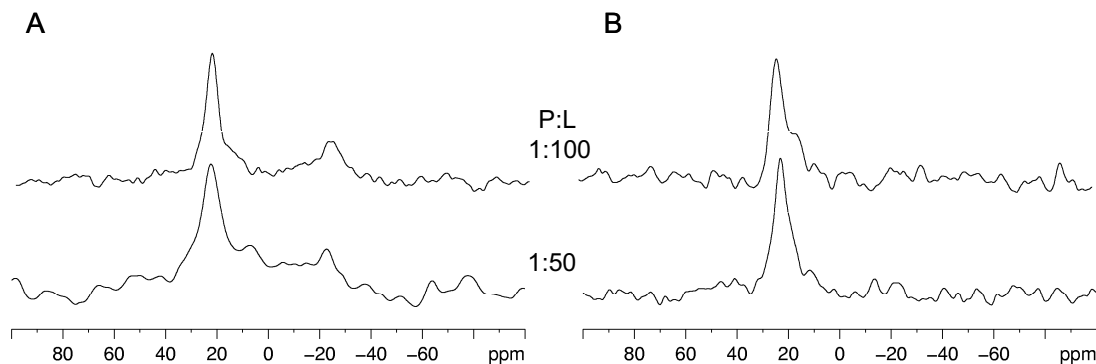


Abbildung 5.29: ^{31}P -NMR-Spektren von PDGFR β -TM rekonstituiert in (A) DMPC- und (B) POPC-Doppelschichten auf Glasplättchen in unterschiedlichen P:L-Verhältnissen. Die DMPC-Spektren wurden bei 37 °C, die POPC-Spektren bei Raumtemperatur gemessen.

Alle Spektren zeigen eine uniaxiale Orientierung der Phospholipide mit der Membrannormalen parallel zum Magnetfeld, da sich die Hauptintensität des Signals links von der isotropen Position (ca. 0 ppm) zwischen 15 – 30 ppm befindet. Da nur ein kleines Pulversignal bei ca. -20 ppm detektiert wurde, war sichergestellt, dass die Phospholipide auch in Anwesenheit von PDGFR β -TM orientierte Lipiddoppelschichten bezüglich des Magnetfelds ausbilden.

Um die Ausrichtung von PDGFR β -TM selbst in orientierten Membranen zu untersuchen, wurden eindimensionale ^{15}N -Festkörper-NMR-Messungen durchgeführt. Ein in die Membran senkrecht eingebettetes α -helikales Protein (transmembrane Orientierung) besitzt typischerweise eine anisotrope chemische Verschiebung im Bereich von 150 – 200 ppm. Im Vergleich dazu besitzt ein Protein, welches flach auf der Membran ausgerichtet ist (parallele Orientierung), eine anisotrope chemische Verschiebung im Bereich von 70 – 100 ppm. In Abbildung 5.30 A,B sind die ^{15}N -NMR-Spektren von PDGFR β -TM in orientierten DMPC- und POPC-Doppelschichten mit einem P:L-Verhältnis von 1:50 dargestellt.

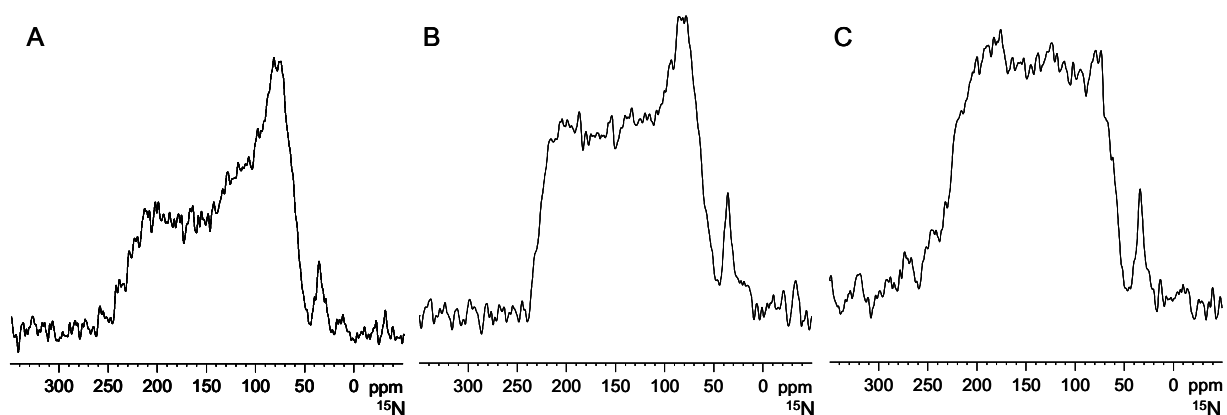


Abbildung 5.30: ^{15}N -NMR-Spektren von PDGFR β -TM rekonstituiert in (A) POPC- und (B), (C) DMPC-Doppelschichten auf Glasplättchen bei Raumtemperatur (POPC) bzw. 37 °C (DMPC). Das P:L-Verhältnis beträgt in (A) und (B) 1:50 und in (C) 1:200.

Die Spektren zeigen ein breites Signal zwischen 60 – 250 ppm, welches den kompletten Bereich der anisotropen chemischen Verschiebung umfasst. Die hohe Signalintensität im Bereich zwischen 60 – 90 ppm zeigt, dass ein großer Anteil der Proteinmoleküle nicht orientiert vorliegt. Weiterhin zeigen die Spektren Signalintensität um die isotrope Position zwischen 100 – 130 ppm, welche von beweglichen Anteilen des Proteins stammen. Das Signal bei ca. 40 ppm kommt wahrscheinlich von der Aminogruppe der Seitenkette der Lysine. Im Vergleich zu POPC-Membranen weisen DMPC-Membranen einen größeren Anteil von transmembran orientiertem PDGFR β -TM Protein auf, was sich an der erhöhten Intensität im Bereich zwischen 150 – 200 ppm widerspiegelt. Es wurde eine weitere ^{15}N -Messung in DMPC-Membranen mit einem P:L-Verhältnis von 1:200 durchgeführt. Das Spektrum (Abbildung 5.30 C) zeigt ebenfalls ein breites Signal im Bereich zwischen 60 – 250 ppm. Die Signalintensität im Bereich zwischen

150 - 200 ppm ist jedoch im Vergleich zu dem Spektrum mit einem P:L-Verhältnis von 1:50 deutlich erhöht. Dies zeigt, dass sich PDGFR β -TM in DMPC-Membranen mit einem niedrigen P:L-Verhältnis von 1:200 besser orientiert als bei der höheren Proteinkonzentration. Im Vergleich hierzu zeigten die OCD-Spektren von PDGFR β -TM in DMPC-Doppelschichten keine Unterschiede für verschiedene P:L-Verhältnisse (Kapitel 5.2.2, Abbildung 5.12). Grund dafür könnte die Probenpräparation sein, da die Proteinmenge in den OCD-Proben im μg -Bereich liegt, während für die NMR-Messungen Proteinmengen im mg-Maßstab eingesetzt werden müssen. Dies bedingt, dass das Protein in den OCD-Proben in einem 30 fach größeren Volumen rekonstituiert wird als in den NMR-Proben und es deswegen vermutlich weniger zu unspezifischer Aggregation kommt.

Darüber hinaus wurde PDGFR β -TM in magnetisch orientierten Bizellen untersucht, welche in der Festkörper-NMR häufig genutzt werden. Im Unterschied zu mechanisch orientierten Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen orientieren sich Bizellen mit der Membrannormalen senkrecht zum Magnetfeld. Durch die Zugabe von Lanthanoid-Ionen (Yb^{3+}) kann die Ausrichtung der Bizellen jedoch um 90° gedreht werden.

Es wurden Bizellen bestehend aus DMPC (langkettiges Lipid) und 6-O-PC (etherverknüpftes Analogon zu DHPC, kurzkettiges Lipid) mit $q = 3,2$ und $q = 5,0$ verwendet. Weiterhin wurde eine Bizellenprobe aus DMPC/DMPG (80:20 w/w) und 6-O-PC mit einem q -Wert von 3,2 untersucht. Da die Orientierung der Bizellen neben dem q -Verhältnis (der q -Wert gibt das Verhältnis von lang- und kurzkettigen Lipiden an) auch von der Temperatur abhängt, wurde eine ^{31}P -Temperaturserie sowohl von den puren Bizellen als auch von den Bizellen in welchen PDGFR β -TM eingebettet ist, gemessen. Die Anfangstemperatur jeder Serie betrug $12,5^\circ\text{C}$, wobei in einem Abstand von $2,5^\circ\text{C}$ die Temperatur bis 45°C erhöht wurde. Bei tiefen Temperaturen liegen gemischte Mizellen vor, wobei sich ab einer charakteristischen Übergangstemperatur orientierte Bizellen ausbilden. Wird die Temperatur über diesen Bereich hinaus erhöht, kommt es zur Auflösung der Bizellen, wobei ein Gemisch aus Vesikeln, Mizellen und Bizellen entsteht. Tabelle 5.7 gibt eine Übersicht über den Temperaturbereich, in welchem das jeweilige Bizellensystem mit der Membrannormalen senkrecht zum Magnetfeld orientiert ist.

Tabelle 5.7: Übersicht über den Temperaturbereich in welchem sich die verschiedenen Bizellen senkrecht zum Magnetfeld orientieren. T_2 und T_1 bezeichnen die höchste bzw. niedrigste Temperatur bei welcher die Bizellen ausgerichtet sind.

Bizellensystem	q-Verhältnis	Temperaturbereich orientierter Bizellen $T_2 - T_1$ [°C]	Mittlere Temperatur $(T_2+T_1)/2$ [°C]
DMPC/6-O-PC	3,2	12,5	36
DMPC/6-O-PC + PDGFR β -TM	3,2	2,5	34
DMPC/DMPG/6-O-PC	3,2	15	35
DMPC/DMPG/6-O-PC + PDGFR β -TM	3,2	12,5	34
DMPC/6-O-PC	5,0	7,5	29
DMPC/6-O-PC + PDGFR β -TM	5,0	5,5	25

Alle untersuchten Bizellensysteme bilden in Abwesenheit von PDGFR β -TM innerhalb eines Temperaturbereichs von ca. 7,5 – 15 °C orientierte Bizellen aus. Durch die Rekonstitution von PDGFR β -TM verschmälert sich der Temperaturbereich der orientierten Bizellen in allen Systemen, wobei Bizellen aus DMPC/6-O-PC mit $q = 3,2$ nur in einem Bereich von 2,5 °C orientiert sind. Bei einem q-Verhältnis von 5,0 sind die Bizellen über einen Bereich von 5,5 °C stabil, während Bizellen aus DMPC/DMPG/6-O-PC ($q=3,2$) in einem Temperaturbereich von 12,5 °C orientiert sind.

Um die Ausrichtung des PDGFR β -TM Proteins in diesen Membranmodellen zu untersuchen, wurden ^{15}N -Spektren bei den Temperaturen gemessen, bei welcher die Bizellen die beste Orientierung zeigten (Abbildung 5.31). Die ^{15}N -Spektren von PDGFR β -TM in DMPC/6-O-PC und DMPC/DMPG/6-O-PC mit $q = 3,2$ zeigen ein Signal um die isotrope Position bei 120 ppm. Dies zeigt, dass das Protein in diesen Modellmembranen nicht gut orientiert ist beziehungsweise eine große Mobilität aufweist, so dass alle Orientierungen ausgemittelt werden. Bei einem q-Verhältnis von 5,0 zeigt das ^{15}N -Spektrum von PDGFR β -TM in DMPC/6-O-PC Bizellen kaum Signalintensität bei 120 ppm.

Die Hauptintensität zeigt eine anisotrope chemische Verschiebung im Bereich zwischen 80 – 110 ppm, was für eine transmembran orientierte α -Helix spricht, welche eine schräge Ausrichtung bezüglich der Membrannormalen einnimmt.

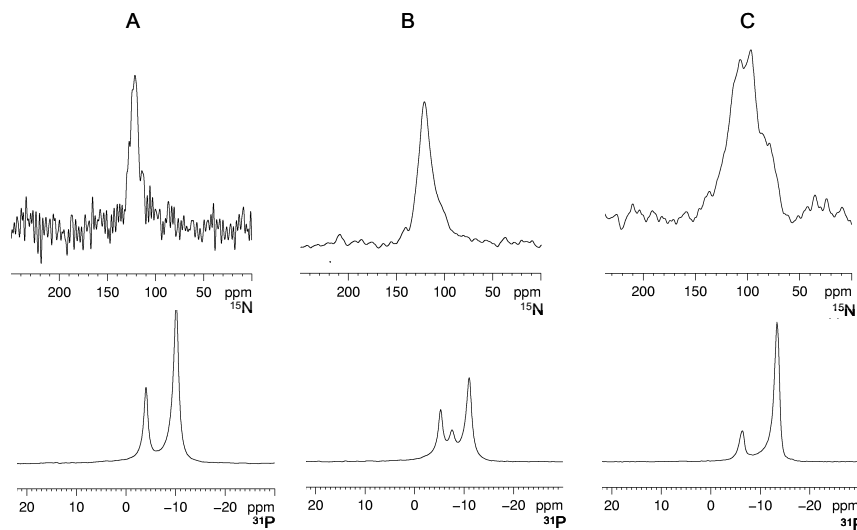


Abbildung 5.31: PDGFR β -TM rekonstituiert in Bizellen. Die obere Reihe zeigt die ^{15}N -Spektren, die untere Reihe die dazugehörigen ^{31}P -Spektren. (A) DMPC/6-O-PC Bizellen, $q = 3,2$; $T = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$, (B) DMPC/DMPG (80:20) /6-O-PC Bizellen, $q = 3,2$; $T = 37,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, (C) DMPC/6-O-PC Bizellen, $q = 5,0$; $T = 27,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. In den ^{31}P -Spektren stammt das am weitesten tieffeldverschobene Signal von 6-O-PC, das am weitesten hochfeldverschobene Signal von DMPC.

5.4.2 Strukturanalyse von PDGFR β -TM in orientierten Membranen

Nach der Optimierung der geeigneten Rekonstitutionsmethode in orientierten Modellmembranen wurde die Orientierung von PDGFR β -TM analysiert.

In mechanisch orientierten DMPC-Doppelschichten hatte sich für ein P:L-Verhältnis von 1:200 die beste Orientierung gezeigt, wobei selbst hier ein Teil der Moleküle nicht orientiert vorliegt (siehe Kapitel 5.4.1, Abbildung 5.30 C). Um nähere Aussagen über die Orientierung von PDGFR β -TM zu treffen, wurden weitere ^{15}N -Experimente der Probe gemessen, welche in verschiedenen Winkeln bezüglich des Magnetfelds ausgerichtet wurde (Abbildung 5.32). Das ^{15}N -Spektrum, welches in einem 90° Winkel der Probe zum Magnetfeld gemessen wurde, zeigt ein breites Signal im Bereich zwischen 60 – 150 ppm. Die Signale der nicht orientierten Proteinmoleküle besitzen die gleichen anisotropen chemischen Verschiebungen, unabhängig von der Ausrichtung der Probe und befinden sich daher auf der gleichen Position. Im Unterschied dazu wird das Signal, welches von den orientierten Proteinmolekülen stammt, um die isotrope Position bei ca. 120 ppm gespiegelt und der Abstand zur isotropen Position um den Faktor $-1/2$ skaliert. Daher zeigt das Signal sowohl die

orientierten als auch die nicht orientierten Moleküle. Weiterhin wurde ein ^{15}N -Spektrum gemessen, in dem die Probe mit ihrer Normalen in einem Winkel von ca. 54° zum Magnetfeld ausgerichtet wurde. Das Signal ist in zwei spektrale Bereiche geteilt. Die Signalintensitäten im Bereich der isotropen Position zwischen 80 – 130 ppm stammen von dem orientierten Anteil von PDGFR β -TM, dessen Anisotropie jetzt aufgrund der Ausrichtung der Moleküle um den magischen Winkel ausgemittelt wird. Das zweite Signal im Bereich von 40 – 80 ppm entspricht dem nicht orientierten Pulveranteil.

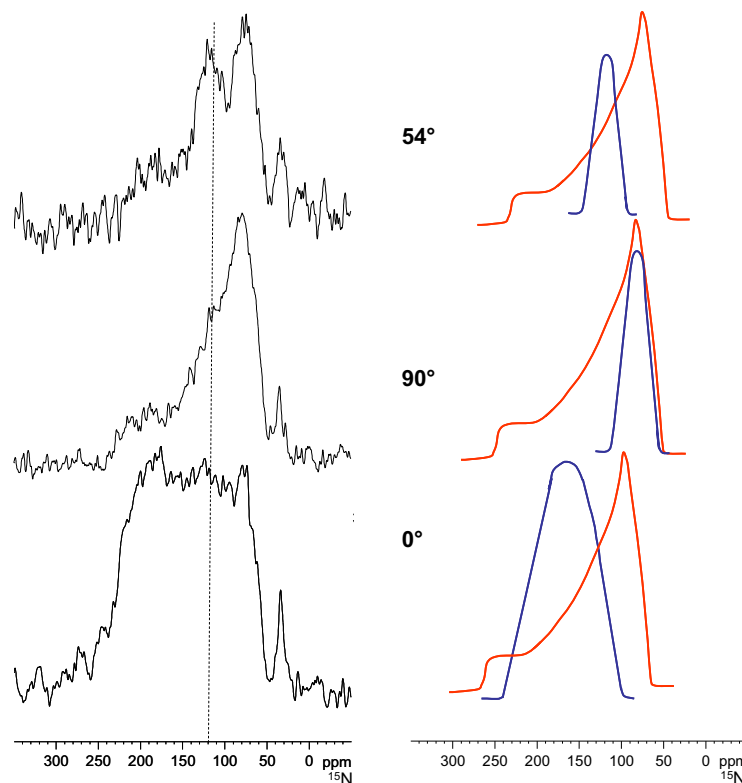


Abbildung 5.32: ^{15}N -NMR-Spektren von PDGFR β -TM rekonstituiert in DMPC-Doppelschichten auf Glasplättchen in einem P:L-Verhältnis von 1:200 bei 37°C (linke Seite). Zur Messung wurde die Probe in einem Winkel von 0° , 90° und 54° in Bezug auf das Magnetfeld ausgerichtet. Die isotrope Position (120 ppm) wird durch die gestrichelte Linie angezeigt. Zur Veranschaulichung sind auf der rechten Seite die jeweiligen Pulverspektren (rote Linie) und die orientierten Proteinanteile (blaue Linie) eingezeichnet.

Die Änderung der anisotropen chemischen Verschiebung des Signals in Abhängigkeit der Orientierung der Probe zum Magnetfeld beweist, dass in orientierten DMPC-Doppelschichten ein großer Anteil von PDGFR β -TM orientiert vorliegt. Ein aufrecht in der Membran insertiertes Protein würde ein schmales Signal bei ca. 200 ppm ergeben. Daher kann aus der relativ großen Breite des orientierten

Signals in der 0° orientierten Probe abgelesen werden, dass PDGFR β -TM schräg in die Membran eingebettet ist und nicht ganz aufrecht in der Membran steht. Weiterhin wird ein gewisser Teil an nicht orientierten Protein erwartet, da die Flüssigkeits-NMR-Struktur zeigt, dass die beiden Termini des Proteins unstrukturiert sind und diese ca. 30 % der Aminosäuresequenz umfassen (siehe Abbildung 5.24).

Überdies wurde die Orientierung von PDGFR β -TM in Bizellen näher untersucht. Die beste Orientierung des Proteins konnte in Bizellen aus DMPC/6-O-PC und $q = 5,0$ erzielt werden, da das ^{15}N -Spektrum wenig Siganlintensität im Bereich der isotropen Position aufzeigte (siehe Kaptiel 5.4.1, Abbildung 5.31 C). Diese stammt, wie beschrieben, vermutlich von den unstrukturierten mobilen Bereichen des Proteins.

Wie bereits erwähnt orientieren sich (ungeflippte) Bizellen im Vergleich zu orientierten Lipiddoppelschichten auf Glasplättchen mit der Membrannormalen senkrecht zum Magnetfeld. Durch Zugabe einer YbCl_3 -Lösung wurde diese Bizellenprobe gefilppt. Dadurch kommt es zu einer Orientierungsänderung der Bizellen, wobei sich diese nun mit der Membrannormalen parallel zum Magnetfeld ausrichten. Die Signale werden daher um die isotrope Position gespiegelt und es kommt zu einer Verdoppelung der chemischen Verschiebungsdimension. Der Erfolg des „Flippens“ wurde anhand eines ^{31}P -Spektrums überprüft (Abbildung 5.33).

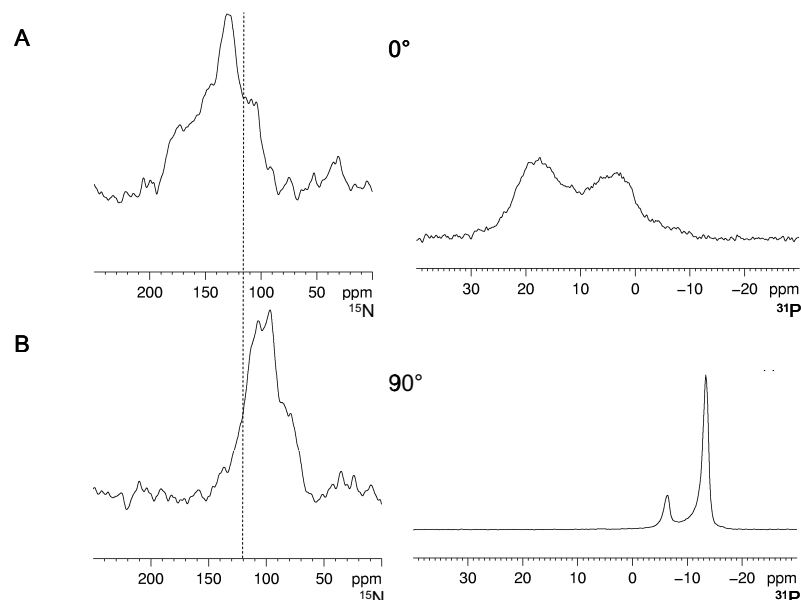


Abbildung 5.33: PDGFR β -TM rekonstituiert in geflippten (A) und ungeflippten (B) DMPC/6-O-PC Bizellen mit $q = 5,0$ in einem P:L-Verhältnis von 1:200. Links sind die ^{15}N -Spektren, rechts die ^{31}P -Spektren dargestellt. Die ungeflippten Bizellen orientieren sich in einem Winkel von 90° , die geflippten in einem Winkel von 0° mit der Membrannormalen zum Magnetfeld. Alle Spektren wurden bei $T = 27,5^\circ\text{C}$ gemessen.

Die ^{31}P -NMR-Signale sind nun in den positiven Bereich des Spektrums gespiegelt, wobei es zu einer Verbreiterung der Linien kommt. Somit war sichergestellt, dass die Bizellen eine parallele Ausrichtung zum Magnetfeld aufweisen. Im Vergleich zum „ungeflippten“ ^{15}N -Spektrum in welchem das Signal im Bereich zwischen 80 – 110 ppm liegt, ist das Signal der „geflippten“ Probe aufgrund der Orientierungsänderung um die isotrope Position gespiegelt, wobei die Hauptintensität des Signals im Bereich zwischen 100 – 190 ppm liegt (Abbildung 5.33 A). Dies zeigt, dass PDGFR β -TM in diesen Bizellen orientiert vorliegt, da Signale von nicht orientierten Molekülen nicht gespiegelt werden. Wie auch in DMPC-Doppelschichten auf Glasplättchen zeigt die relativ große Breite des Signals, dass PDGFR β -TM eine schräge transmembrane Orientierung in den Bizellen einnimmt.

Ein 2D-PISEMA-Experiment konnte bisher noch nicht gemessen werden, da das Signal-zu-Rausch-Verhältnis nicht ausreichend ist.

6. Diskussion

Der Transmembranhelix von Rezeptor-Tyrosinkinasen wurde in der Vergangenheit keine besondere Bedeutung zugesprochen, da angenommen wurde, dass diese lediglich als Membrananker dient, welcher die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne mit der intrazellulären Kinasedomäne verbindet. Inzwischen wird zwar davon ausgegangen, dass die TMD eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Rezeptorfunktion einnimmt, wobei sie aktiv bei der Rezeptordimerisierung beteiligt ist, aber der genaue Mechanismus unbekannt bleibt. In den letzten Jahren konnte für einige RTKs gezeigt werden, dass deren Transmembransegmente die intrinsische Fähigkeit zur Dimerisierung aufweisen [77,115-119]. *In vivo* Fluoreszenz-Untersuchungen des EGF-Rezeptors ergaben beispielsweise, dass dieser sogar in Abwesenheit eines Liganden auf der Zelloberfläche als Dimer vorkommt [8].

Die hier vorgenommene Charakterisierung des rekombinant hergestellten PDGFR β -TM Proteins mittels SDS-PAGE und MALDI-TOF Massenspektrometrie zeigte, dass dieses Transmembransegment ohne äußere Einflüsse dimerisiert. Während im MALDI-Massenspektrum neben dem Dimer keine weiteren höheren Oligomere detektiert werden konnten, zeigte das SDS-Gel mehrere Banden, welche mit den Massen eines Di-, Tri- und Tetramers übereinstimmen (Kapitel 5.1.3, Abbildung 5.7 und 5.8). Allerdings kann hierbei nicht entschieden werden, ob es sich bei den höheren Oligomeren (Trimer und Tetramer) um Artefakte handelt, welche durch unerwartete Interaktionen des Proteins mit dem Detergenz zustande kommen, oder ob diese Banden das wahre Oligomerisierungsverhalten widerspiegeln. In der Literatur wurde ein ähnliches Verhalten für ein synthetisch hergestelltes Homolog der Dimerisierungsdomäne des Transkriptionsfaktors GCN4 beschrieben, welches aufgrund spezifischer Interaktion mit den Detergenzmolekülen im SDS-Gel als Dimer identifiziert wurde. FRET-Messungen, die unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, zeigten, dass es sich hierbei allerdings um das Monomer handelt [120].

Die Detektion des nicht-kovalenten Dimers mittels Massenspektrometrie deutet auf eine große Stabilität des PDGFR β -TM Dimers hin, da im Allgemeinen nicht-kovalente Komplexe unter den Bedingungen der Massenspektrometrie zerfallen. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung sind allerdings nur bedingt

interpretierbar, da für die Messung lyophilisiertes Proteinpulver in einem Gemisch aus Acetonitril und TFA aufgelöst wurde, wodurch sich das Protein in einer nicht-nativen Umgebung befindet. Daher wurde zusätzlich durch chemisches Cross-Linking von PDGFR β -TM versucht, das Oligomerisierungsverhalten mittels MALDI-TOF näher zu untersuchen. Hierzu wurde das Reagenz BS3 (Bissulfosuccinimidylsuberat) verwendet, welches über zwei reaktive Gruppen verfügt, die spezifisch mit dem N-Terminus bzw. der ϵ -Amiogruppe von Lysin reagieren und somit Proteinmoleküle, die räumlich benachbart sind, kovalent miteinander verknüpft. Für diese Untersuchungen wurde PDGFR β -TM in Lipid-Vesikeln rekonstituiert, wodurch eine Umgebung geschaffen werden sollte, die eher nativen Bedingungen entspricht. Leider konnten einzelne Massen nicht eindeutig identifiziert werden, da die Signale sehr verbreitert waren und nur eine Massenverteilung aufzeigten. Allerdings konnte kein Hinweis auf höhere Oligomere gefunden werden. Dies deutet darauf hin, dass PDGFR β -TM ausschließlich Dimere ausbildet. Da die schlechte Qualität der Spektren keine nähere Auswertung erlaubte, sind sie in dieser Arbeit nicht aufgeführt.

Die Bestimmung der Sekundärstrukturanteile von PDGFR β -TM mittels CD-Spektroskopie ergab einen hohen α -helikalen Anteil (Kapitel 5.2.1). In DPC-Mizellen konnte ein Helixanteil von ca. 74 % ermittelt werden (siehe Tabelle 5.2). Dies stimmt sehr gut mit dem aus den NMR-Experimenten in DPC-Mizellen bestimmten helikalen Bereich zusammen, welcher 27 Aminosäuren umfasst und demnach 70 % entspricht (Kapitel 5.3.3, Abbildung 5.20). Der in Liposomen ermittelte Helixanteil war leicht reduziert und betrug ca. 65 % (Tabelle 5.3), wobei für die Transmembrandomäne des EphA1-Rezeptors in DMPC-Liposomen der gleiche helikale Anteil bestimmt wurde [119]. Ein möglicher Grund für den in Detergenzien höheren Helixanteil könnte sein, dass die Einbettung einer verhältnismäßig langen Helix von PDGFR β -TM in die „anschmiegsamere“ Mizelle günstiger ist als in eine Lipiddoppelschicht (siehe unten). Denkbar wäre auch, dass Detergenzien Proteinsequenzen mit geringerer Helixbildungstendenz zusätzlich stabilisieren, was zu einem erhöhten helikalen Anteil beiträgt.

In der Literatur wurden bis jetzt von Arseniev und Mitarbeitern die dreidimensionalen Dimerstrukturen der Transmembransegmente von ErbB2, EphA1, EphA2 sowie des Heterodimers ErbB1/ErbB2 mittels Flüssigkeits-NMR aufgeklärt [77,117-119]. Drei der vier Strukturen (ErbB2, EphA1 und ErbB1/ErbB2) weisen eine rechtsgängige

parallele Anordnung der dimerisierten Helices auf, wobei die Dimerisierung über ein doppeltes N-terminales GX4-Motiv vermittelt wird. Die hochaufgelöste NMR-Struktur von PDGFR β -TM in DPC-Mizellen stellt somit die zweite bekannte linksgängige Dimerstruktur dar (Kapitel 5.3.6.2, Abbildung 5.27). Die Anordnung der beiden Helices des dimerisierten PDGFR β -TM Proteins erfolgt analog zu EphA2-TM durch ein Leucin-Zipper-ähnliches Dimerisierungsmotiv [77]. Im Unterschied zum PDGFR β -TM Dimer, in welchem der C-terminale Bereich des Dimer-Interfaces eine dichte Packung aufweist, da die gegenüberliegenden Aminosäuren in engem Kontakt zueinander stehen und der N-terminale Bereich weniger dicht gepackt ist, weist der schwach polare N-Terminus des Dimer-Interfaces von EphA2-TM eine äußerst dichte Packung auf, während der C-Terminus eine weniger kompakte Struktur besitzt. Ein möglicher Grund hierfür ist die unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung im Vergleich zu PDGFR β -TM. Weiterhin liegen im C-terminalen Bereich des Dimer-Interfaces von EphA2-TM zwei Phenylalanin-Reste, welche durch die Ausbildung von inter- und intramolekularen π - π -Wechselwirkungen der aromatischen Ringe die Dimerstruktur zusätzlich stabilisieren. Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin 498 und Tryptophan 524 von PDGFR β -TM befinden sich nicht im Dimer-Interface sondern sind nach außen gerichtet.

Die Aminosäuresequenzen der Transmembransegmente verschiedener RTKs sind alle sehr unterschiedlich aufgebaut und weisen keine Homologien auf. Gemeinsames Merkmal der Sequenzen ist allerdings das Vorliegen verschiedener Dimerisierungsmotive. Abbildung 6.1 zeigt neben der PDGFR β -TM-Sequenz die Aminosäuresequenzen der Transmembranbereiche der anderen RTKs, deren 3D-Struktur bekannt ist.

EphA1	539	VSRGLTGGE IVAVIFGLLLGAALLLGILVF RSRRA	573
EphA2	530	EGSGNL AVIGGVAVGVVLLLVLAGVGFFI HRRRKN	565
ErbB1	641	PKIP SIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM RRRHIVR	675
ErbB2	645	EQRAS PLTSIISAVVGILLVVVLGVVFGILI KRRQ	679
PDGFRβ	495	SLPFKVV ISAILALVVLTIISLIILIMLW QKKPR	529

Abbildung 6.1: Aminosäuresequenz der Transmembransegmente verschiedener RTKs. Die Sequenzen entsprechen alle den humanen Rezeptoren, wobei die von PDGFR β der Rindersequenz entspricht. Die fett markierten Aminosäuren zeigen die jeweiligen experimentell bestimmten Transmembranbereiche. Die unterstrichenen Aminosäuren gehören einem GX4-Motiv an, während die mit einem Stern gekennzeichneten Reste ein Leucin-Zipper-Motiv ausbilden.

Auffällig ist, dass die Aminosäuresequenzen von EphA1-TM, ErbB1-TM und ErbB2-TM, welche alle eine rechtsgängige Dimerstruktur aufweisen, neben dem N-terminalen GX4-Motiv noch ein weiteres C-terminales GX4-Motiv besitzen. In der rechtsgängigen Anordnung wird dieses jedoch nicht benutzt und befindet sich auf der gegenüberliegenden Seite des Dimer-Interfaces. Neben dem Heptadenmotiv weist die Sequenz von EphA2-TM auch ein N-terminales GX4-Motiv auf, dessen Reste in der linksgängigen Dimerstruktur den umgebenden Lipiden zugewandt sind [77]. Die Aminosäuresequenz von PDGFR β -TM besitzt keine Glycin-Reste. Denkbar wäre nur ein einziges GX4-ähnliches Motiv, welches von Serin 504 - XXX- Alanin 508 ausgebildet wird. Allerdings sind beide Aminosäuren, aufgrund der Größe ihrer Seitenketten, nicht optimal zur Ausbildung der sogenannten „knobs-into-holes“-Packung geeignet.

Das gleichzeitige Auftreten mehrerer Dimerisierungsmotive in den Transmembransegmenten der strukturell untersuchten RTKs lässt vermuten, dass eine Dimerisierung über verschiedene Motive stattfinden kann und die interagierenden Helices somit verschiedene Konformationen einnehmen können. Tatsächlich wird spekuliert, dass EphA1-TM auch in einer linksgängigen Helixanordnung vorkommen kann, in welcher die Dimerisierung über das zweite C-terminale GX4-Motiv verlaufen könnte [119]. Auch für den EphA2-TM Dimer wird vermutet, dass dieser neben der linksgängigen Leucin-Zipper Anordnung auch in einer rechtsgängigen Konformation existieren kann, deren Dimerisierung ebenfalls über das GX4-Motiv erfolgt [77]. Hinweis dafür war die Verdoppelung von Kreuzsignalen im ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrum für beide Proteine. Die Signalverdoppelung könnte aber auch durch eine lokale Veränderung verschiedener Seitenketten herrühren, wie beispielsweise des Glutamats in EphA1-TM, welches sich in Abhängigkeit des pH-Wertes entweder innerhalb oder außerhalb des Dimer-Interfaces befinden kann. Im EphA2-TM Dimer könnte die Verbreiterung und Verdoppelung von Signalen auch durch eine verlangsamte Rotationsausmittlung der Seitenketten der Phenylalanine begründet werden. Welches Szenario vorherrscht ist jedoch ohne weitere aufwändige Strukturaufklärung der zweiten Konformation nicht zu entscheiden.

Arseniev und Mitarbeiter stellten die Hypothese auf, dass der Wechsel von einer linksgängigen (über ein Leucin-Zipper Motiv) in eine rechtsgängige (über das GX4-Motiv) Konformation, oder umgekehrt, den entscheidenden Übergang zwischen den beiden Aktivitätszuständen des Rezeptors darstellt [77,119]. Allerdings ist noch nicht verstanden, was die treibende Kraft für die Ausbildung der einen oder anderen Konformation ist. Im Jahr 2001 wurde von der Arbeitsgruppe von Moriki ein Aktivierungsmechanismus für RTKs vorgeschlagen, welcher die Aktivierung des dimerisierten EGF-Rezeptors ohne vorherige Ligandenbindung erklären sollte [9]. Hiernach bewirkt die Ligandenbindung an die extrazelluläre Domäne zweier bereits dimerisierter Rezeptoren eine Veränderung der Ausrichtung der dimerisierten Transmembranhelices. Dadurch kommt es zur Ausbildung einer andersartigen Helixpackung, die wiederum eine Rotation der intrazellulären Kinasedomänen bewirkt. Infolgedessen werden die Kinasedomänen zweier Rezeptoren in bestimmter Weise zueinander ausgerichtet, wodurch diese phosphoryliert und somit diverse Signalkaskaden eingeschaltet werden.

Detergenz-Mizellen werden häufig als eine artifizielle Umgebung von Membranproteinen angesehen, da sie aufgrund des Fehlens eines genau definierten hydrophoben Bereichs Transmembranproteine jeder Länge solubilisieren können. Die in mizellarer Umgebung gewonnenen Strukturinformationen können daher nicht zwingend auf die native Struktur *in vivo* übertragen werden. Beispielsweise konnte die Struktur der Transmembrandomäne des tetrameren M2-Proteins in DHPC-Mizellen nicht mit der Struktur in Lipiddoppelschichten zur Deckung gebracht werden, weswegen die physiologische Relevanz der Mizellen-Struktur angezweifelt wird [121-123].

Informationen über den Einfluss der Lipidumgebung auf die Orientierung von PDGFR β -TM konnte erstmalig im Rahmen dieser Arbeit aus OCD-Messungen gewonnen werden. Die Abschätzung des Helix-Neigungswinkels anhand von OCD-Spektren stellt bisher keine gebräuchliche Methode in der Literatur dar. Sie wurde nach der ursprünglichen Beschreibung 1987 nur ein einziges Mal angewandt, weswegen außer einem einzigen Referenzdatensatz keine weitere Datenbasis vorliegt [91,92].

In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass sich mit zunehmender Dicke der hydrophoben Lipiddoppelschicht von DMPC (~ 25 Å) nach POPC (~ 27 Å) zu DEPC (~ 32 Å) der Helix-Neigungswinkel von PDGFR β -TM bezüglich der Membrannormale von $\sim 30^\circ$ über $\sim 20^\circ$ zu $\sim 10^\circ$ verringert (Kapitel 5.2.2, Tabelle 5.4) [124,125]. Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit der Hypothese des „Lipid-Mismatch“ überein, wonach eine hydrophobe Transmembranhelix, welche länger als die effektive Dicke der Membran ist, ihren Neigungswinkel in dem Maße anpasst, dass sie optimal in die Lipidschicht eingebettet wird (Abbildung 6.2) [126,127].

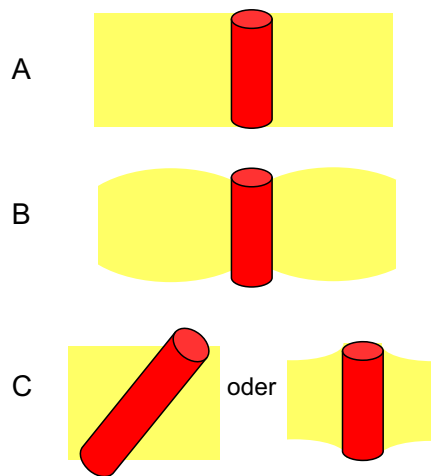


Abbildung 6.2: Schematische Darstellung des Lipid-Mismatch Effekts. In (A) entspricht die Länge der Helix der Dicke der Lipidmembran, so dass sie optimal eingebettet wird. In (B) ist die Helix zu kurz, in (C) zu lang.

Die Auswertung der ^{15}N -NOESY-Spektren (Kapitel 5.3.3, Abbildung 5.22) ergab, dass der Transmembranbereich von PDGFR β -TM in einer „entspannten“ Mizellenumgebung ca. 22 Aminosäuren umfaßt mit einer Länge von ca. 33 Å (Abstand Valin 501 C' – Leucin 523 C'). Dies entspricht optimal der Lipiddicke von DEPC-Membranen, wo tatsächlich eine nahezu senkrechte Orientierung des Proteins gefunden wurde.

Weiterhin deuten die Festkörper-NMR-Spektren von PDGFR β -TM in orientierten DMPC-Membranen und DMPC/6-O-PC Bizellen auf einen ausgeprägten Neigungswinkel des Proteins hin, welcher vermutlich größer ist als 20° , was für die Richtigkeit der OCD-Ergebnisse spricht (Kapitel 5.4.2, Abbildung 5.32 und 5.33). Ein zweidimensionales PISEMA-Experiment, welches erlaubt den exakten Neigungswinkel von PDGFR β -TM in Membranen zu bestimmen, konnte aufgrund von Sensitivitätsproblemen noch nicht durchgeführt werden.

Die hochaufgelöste NMR-Struktur des PDGFR β -TM Dimers in Mizellen weist einen Helix-Kreuzwinkel von ca. 20° auf. Dies entspricht einem nominellen Helix-Neigungswinkel des Proteins von 10°, wenn PDGFR β -TM symmetrisch in einer Membran eingebettet wäre. Die NMR-Struktur stimmt demnach sehr gut mit dem Neigungswinkel in DEPC-Membranen überein, welcher mittels OCD-Spektroskopie bestimmt wurde. Deshalb kann man annehmen, dass PDGFR β -TM auch in DEPC-Membranen die linksgängige Leucin-Zipper Konformation annimmt. Der ausgeprägte Neigungswinkel von PDGFR β -TM in wesentlich dünneren DMPC-Membranen könnte dann einerseits durch eine seitliche Kippung des kompletten Dimers um 20° innerhalb der Membran entstehen. Andererseits könnte er auch aus einer Vergrößerung des nominellen Helix-Kreuzwinkels auf bis zu 60° hervorgehen. Vergleicht man die hier vorliegenden Ergebnisse mit den bereits bekannten RTK-Strukturen, so beträgt der Helix-Kreuzwinkel von EphA1-TM ca. 42° [119] und wäre sehr gut mit dem Neigungswinkel von 20°, welcher in POPC-Membranen abgeschätzt wurde vereinbar, ohne eine weitere Kippung des Dimers in der Membran annehmen zu müssen. MD-Simulationen für EphA1-TM haben gezeigt, dass der Dimer eine leicht gekippte Orientierung in der DMPC-Membran aufweisen könnte. Zusammengenommen würde dies einem Neigungswinkel >25° entsprechen, was sehr gut mit dem gemessenen Wert für PDGFR β -TM in DMPC-Membranen übereinstimmt.

Aus den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die signifikante Änderung des Neigungswinkels von PDGFR β -TM in DEPC- im Vergleich zu DMPC-Membranen durch einen Übergang von zwei unterschiedlichen Dimer-Konformationen hervorgeht. Welche dieser beiden Konformation PDGFR β -TM einnimmt, wird dabei von der Dicke der Membran bestimmt. In dünnen Membranen wäre eine rechtsgängige Struktur denkbar, in welcher die Helices über ein GX4-ähnliches Motiv (Serin 504-XXX-Alanin 508) dimerisieren. In dicken Membranen könnte sich analog zur hier beobachteten NMR-Struktur eine linksgängige Struktur ausbilden, in welcher die Dimerisierung über ein Leucin-Zipper-Motiv erfolgt (siehe Abbildung 6.3).

Da PDGFR β -TM in dickeren Membranen vermutlich die gleiche Struktur wie in DPC-Mizellen besitzt, spricht der in dieser Arbeit bestimmten NMR-Struktur von PDGFR β -TM eine physiologische Bedeutung zu.

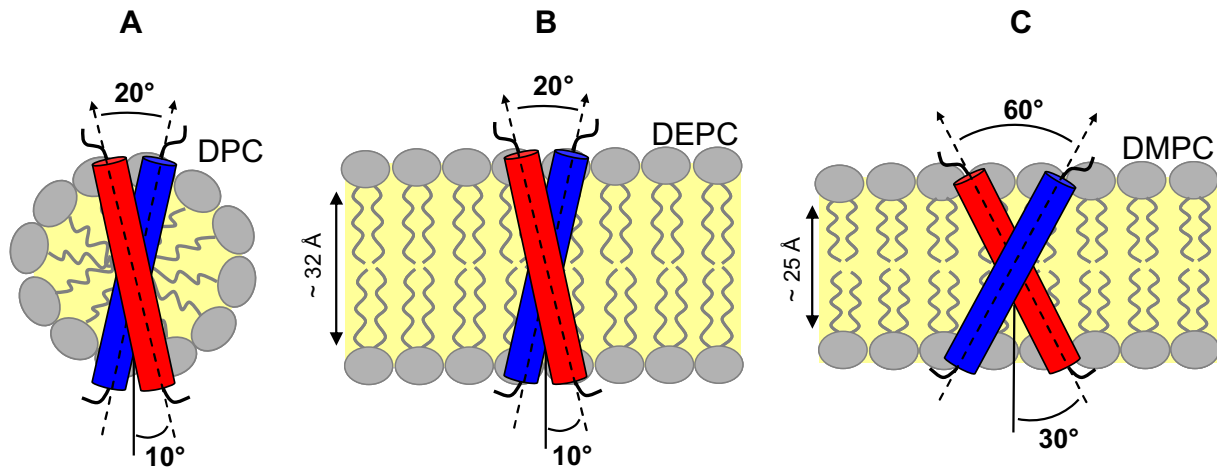


Abbildung 6.3: Dimerisierung von PDGFR β -TM in einer linksgängigen Struktur (A und B) mit kleinem Helix-Kreuzwinkel in DPC-Mizellen bzw. dicken DEPC-Membranen und in einer rechtsgängigen Struktur (C) mit großem Helix-Kreuzwinkel in dünnen DMPC-Membranen.

In der Literatur ist beschrieben, dass Lipid Mikrodomänen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion von RTKs spielen [128]. Hierbei handelt es sich um Membraneinstülpungen der Plasmamembran, den sogenannten Caveolen. Diese bestehen hauptsächlich aus Lipid Rafts und dem Protein Caveolin und sind aus langkettigen Sphingolipiden sowie Cholesterol aufgebaut. *In vivo* liegen Lipid Rafts im flüssigkristallinen Zustand vor, wobei die Dicke der Lipidschicht im Vergleich zu der umgebenen Plasmamembran enorm vergrößert ist [129]. Auch für den PDGF-Rezeptor β ist bekannt, dass dieser in seinem nativen Zustand sowohl in der Plasmamembran als auch in Lipid Rafts vorliegen kann [128,130]. Dies lässt spekulieren, dass es je nach Aktivitätszustand zu einer Umverteilung des Rezeptors zwischen dicken und dünnen Membranbereichen kommt, in welcher PDGFR β unterschiedliche Konformationen einnehmen kann.

7. Ausblick

Verschiedene neue Fragestellungen haben sich durch die vorliegende Arbeit, welche zum ersten Mal Einblicke in die Dimerisierung von PDGFR β -TM lieferte, ergeben.

Die OCD-Ergebnisse zeigen, dass sich der Neigungswinkel von PDGFR β -TM in Abhängigkeit der Lipiddicke ändert, was auf das Vorliegen einer zweiten Konformation des Proteins hindeutet. Daher stellt sich die Frage, ob der Neigungswinkel in dünnen DMPC-Membranen tatsächlich einer grundsätzlich anderen Anordnung der Helices entspricht, wie es zum Beispiel über das Ser - XXX - Ala Motiv denkbar wäre. Die Messung eines 3D ^{13}C -gefilterten, ^{13}C -editierten NOESY-Experiments in isotropen DMPC/DHPC Bizellen könnte zeigen, ob in dieser Umgebung die Dimerisierung über andere Aminosäurereste erfolgt und sich dabei eine rechtsgängige Konformation ausbildet. Allerdings handelt es sich bei Bizellen um ein voluminöseres membranimitierendes System im Vergleich zu Mizellen. Deshalb ist nicht abzusehen, ob die Spektrenqualität für eine Auswertung ausreichend ist. Darüberhinaus liegen im kommerziell erhältlichen deuterierten DMPC-Lipid nur die beiden Acylketten deuteriert vor, während das Detergenz DHPC aus Kostengründen nicht-deuteriert verwendet wird. Daher könnten Probleme aufgrund einer erhöhten Relaxationsgeschwindigkeit und einem damit verbundenen schlechten Signal-zu-Rausch-Verhältnis auftreten. Möglicherweise müssen auch die Resonanzsignale aufgrund der veränderten chemischen Umgebung neu zugeordnet werden.

Die OCD-Spektroskopie erlaubt nur eine Abschätzung des Helix-Neigungswinkels in der Membran. Anhand von 2D-Festkörper-NMR-Experimenten (PISEMA) in orientierten Lipiddoppelschichten könnte eine exakte Bestimmung des Helix-Neigungswinkels sowie des azimuthalen Drehwinkels erfolgen. Bizellen aus DMPC/6-O-PC und einem q-Verhältnis von 5,0 ergaben bisher die beste Orientierung des Proteins. Aufgrund des hohen Protein-zu-Lipid-Verhältnisses in dieser Probe ist zur Zeit die Proteinmenge für ein solches Experiment nicht ausreichend, weswegen die Herstellung orientierter Proben weiter optimiert werden muss.

Ein langfristiges Ziel des Projekts ist die Strukturbestimmung des tetrameren Bündels aus PDGFR β -TM und dem E5-Protein in Modellmembranen. Hierfür muss zunächst die Interaktion der beiden Membranproteine gezeigt werden. FRET (Förster-

Resonanz-Energie-Transfer)-Messungen wären eine Möglichkeit dies experimentell zu bestätigen, da hierbei der Abstand zwischen den Proteinen ermittelt werden kann. Weiterhin könnte der Komplex bestehend aus dem E5-Dimer und PDGFR β -TM in orientierten Modellmembranen mittels Festkörper-NMR-Messungen untersucht werden. Ein Vergleich des Neigungswinkels von PDGFR β -TM vor und nach der Zugabe von E5 könnte wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der Rezeptoraktivierung anhand des viralen Proteins liefern. Zudem könnten Abstandsmessungen zwischen den beiden Proteinen mittels REDOR-Experimenten durchgeführt werden. Die dadurch gewonnenen Informationen könnten genutzt werden, um Einblicke in die molekularen Mechanismen zu erlangen wie E5 die Rezeptoraktivität verändert. Dies könnten wichtige Ansatzpunkte für die therapeutische Behandlung von Virusinfektionen und dadurch bedingten Krebs darstellen.

8. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mittels CD und NMR die Struktur des Transmembransegments des PDGF-Rezeptors untersucht werden, welches bei der Rezeptoraktivierung die Weiterleitung des Signals durch die Membran übernimmt.

Hierzu konnte ein Protokoll erarbeitet werden, um PDGFR β -TM biosynthetisch durch Überexpression in *E. coli* kostengünstig und in ausreichenden Mengen ^{15}N - bzw. $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -isotopenmarkiert herzustellen und aufzureinigen.

Die Charakterisierung mittels SDS-PAGE und MALDI-TOF Massenspektrometrie ergab, dass PDGFR β -TM eine starke intrinsische Tendenz zur Oligomerisierung, insbesondere zur spontanen Dimerisierung, aufweist.

Mittels CD-Untersuchungen in verschiedenen membranähnlichen Umgebungen wurde ein α -helikaler Sekundärstrukturanteil von 65 – 80 % nachgewiesen. OCD-Messungen zeigten, dass PDGFR β -TM in Lipidmembranen eine transmembrane Orientierung einnimmt und der Neigungswinkel der Helix stark von der Schichtdicke der Membran abhängt. Mit zunehmender Dicke der Lipiddoppelschicht (DMPC \rightarrow POPC \rightarrow DEPC) wurde eine Verringerung des Neigungswinkels von PDGFR β -TM beobachtet ($30^\circ \rightarrow 20^\circ \rightarrow 10^\circ$), was sehr gut mit der Hypothese des Lipid-Mismatch übereinstimmt. Für die genaue Bestimmung des Neigungswinkels in orientierten Membranen mittels Festkörper-NMR konnte die Herstellung orientierter Proben weitgehend optimiert werden. Die ersten 1D-Spektren deuten darauf hin, dass PDGFR β -TM in dünnen Membranen eine schräge Orientierung einnimmt, was mit den OCD-Ergebnissen übereinstimmt.

Anhand von Flüssigkeits-NMR wurde die 3D-Struktur des PDGFR β -TM Segments in DPC-Mizellen aufgeklärt, welches eine durchgehende, leicht gekrümmte α -Helix aufweist. Da das Protein in den Mizellen als Dimer vorliegt, konnte über ein 3D ^{13}C -gefiltertes, ^{13}C -editiertes NOESY-Experiment die Aminosäurereste des Dimer-Interfaces erfolgreich ermittelt werden. Die 3D-Dimerstruktur zeigt, dass die beiden PDGFR β -TM Helices durch ein Leucin-Zipper ähnliches Motiv dimerisieren, wobei sich eine linksgängige coiled-coil Struktur ausbildet. Der Helix-Kreuzwinkel beträgt hierbei ca. 20° , was einem Neigungswinkel von ca. 10° in einer Membrenumgebung entspricht.

Die Tatsache, dass PDGFR β -TM verschiedene Neigungswinkel je nach Membrenumgebung einnimmt und für homologe TM-Dimere eine rechtsgängige

Anordnung mit wesentlich größerem Helix-Kreuzwinkel beobachtet wurde, führt zu der Hypothese, dass das PDGFR β -TM Dimer durch die Lipidumgebung bedingt verschiedene Konformationen einnehmen kann. Diese unterschiedlichen Konformationen könnten dem inaktiven und dem aktivierten Zustand entsprechen, die üblicherweise durch Ligandenbindung ineinander übergeführt werden.

9. Literaturverzeichnis

- [1] Robinson, D.R., Wu, Y.M. and Lin, S.F. (2000) The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 19, 5548-57.
- [2] Ullrich, A. and Schlessinger, J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 203-12.
- [3] Hubbard, S.R. (1999) Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Prog Biophys Mol Biol* 71, 343-58.
- [4] Van Obberghen, E. (1994) Signalling through the insulin receptor and the insulin-like growth factor-I receptor. *Diabetologia* 37 Suppl 2, S125-34.
- [5] McKern, N.M., Lawrence, M.C., Streltsov, V.A., Lou, M.Z., Adams, T.E., Lovrecz, G.O., Elleman, T.C., Richards, K.M., Bentley, J.D., Pilling, P.A., Hoyne, P.A., Cartledge, K.A., Pham, T.M., Lewis, J.L., Sankovich, S.E., Stoichevska, V., Da Silva, E., Robinson, C.P., Frenkel, M.J., Sparrow, L.G., Fernley, R.T., Epa, V.C. and Ward, C.W. (2006) Structure of the insulin receptor ectodomain reveals a folded-over conformation. *Nature* 443, 218-21.
- [6] Yarden, Y. and Ullrich, A. (1988) Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 57, 443-78.
- [7] Schlessinger, J. (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-25.
- [8] Tao, R.H. and Maruyama, I.N. (2008) All EGF(ErbB) receptors have preformed homo- and heterodimeric structures in living cells. *J Cell Sci* 121, 3207-17.
- [9] Moriki, T., Maruyama, H. and Maruyama, I.N. (2001) Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain. *J Mol Biol* 311, 1011-26.
- [10] Blits-Huizinga, C.T., Nelersa, C.M., Malhotra, A. and Liebl, D.J. (2004) Ephrins and their receptors: binding versus biology. *IUBMB Life* 56, 257-65.
- [11] Wimmer-Kleikamp, S.H., Janes, P.W., Squire, A., Bastiaens, P.I. and Lackmann, M. (2004) Recruitment of Eph receptors into signaling clusters does not require ephrin contact. *J Cell Biol* 164, 661-6.
- [12] Shim, A.H., Liu, H., Focia, P.J., Chen, X., Lin, P.C. and He, X. (2010) Structures of a platelet-derived growth factor/propeptide complex and a platelet-derived growth factor/receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 11307-12.
- [13] Lemmon, M.A., Bu, Z., Ladbury, J.E., Zhou, M., Pinchasi, D., Lax, I., Engelman, D.M. and Schlessinger, J. (1997) Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer. *Embo J* 16, 281-94.
- [14] Spivak-Kroizman, T., Lemmon, M.A., Dikic, I., Ladbury, J.E., Pinchasi, D., Huang, J., Jaye, M., Crumley, G., Schlessinger, J. and Lax, I. (1994) Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. *Cell* 79, 1015-24.
- [15] Holland, S.J., Peles, E., Pawson, T. and Schlessinger, J. (1998) Cell-contact-dependent signalling in axon growth and guidance: Eph receptor tyrosine kinases and receptor protein tyrosine phosphatase beta. *Curr Opin Neurobiol* 8, 117-27.
- [16] Flanagan, J.G. and Vanderhaeghen, P. (1998) The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci* 21, 309-45.

- [17] Stein, E., Lane, A.A., Cerretti, D.P., Schoecklmann, H.O., Schroff, A.D., Van Etten, R.L. and Daniel, T.O. (1998) Eph receptors discriminate specific ligand oligomers to determine alternative signaling complexes, attachment, and assembly responses. *Genes Dev* 12, 667-78.
- [18] Davis, S., Gale, N.W., Aldrich, T.H., Maisonpierre, P.C., Lhotak, V., Pawson, T., Goldfarb, M. and Yancopoulos, G.D. (1994) Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity. *Science* 266, 816-9.
- [19] Bell, C.A., Tynan, J.A., Hart, K.C., Meyer, A.N., Robertson, S.C. and Donoghue, D.J. (2000) Rotational coupling of the transmembrane and kinase domains of the Neu receptor tyrosine kinase. *Mol Biol Cell* 11, 3589-99.
- [20] Heldin, C.H. (1995) Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80, 213-23.
- [21] Blume-Jensen, P. and Hunter, T. (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411, 355-65.
- [22] Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A. and et al. (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707-12.
- [23] Ross, R., Glomset, J., Kariya, B. and Harker, L. (1974) A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 1207-10.
- [24] Heldin, C.H. and Westermark, B. (1999) Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 79, 1283-316.
- [25] Betsholtz, C., Johnsson, A., Heldin, C.H., Westermark, B., Lind, P., Urdea, M.S., Eddy, R., Shows, T.B., Philpott, K., Mellor, A.L. and et al. (1986) cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumour cell lines. *Nature* 320, 695-9.
- [26] Doolittle, R.F., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., Devare, S.G., Robbins, K.C., Aaronson, S.A. and Antoniades, H.N. (1983) Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science* 221, 275-7.
- [27] Li, X., Ponten, A., Aase, K., Karlsson, L., Abramsson, A., Uutela, M., Backstrom, G., Hellstrom, M., Bostrom, H., Li, H., Soriano, P., Betsholtz, C., Heldin, C.H., Alitalo, K., Ostman, A. and Eriksson, U. (2000) PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nat Cell Biol* 2, 302-9.
- [28] LaRochelle, W.J., Jeffers, M., McDonald, W.F., Chillakuru, R.A., Giese, N.A., Lokker, N.A., Sullivan, C., Boldog, F.L., Yang, M., Vernet, C., Burgess, C.E., Fernandes, E., Deegler, L.L., Rittman, B., Shimkets, J., Shimkets, R.A., Rothberg, J.M. and Lichenstein, H.S. (2001) PDGF-D, a new protease-activated growth factor. *Nat Cell Biol* 3, 517-21.
- [29] Bergsten, E., Uutela, M., Li, X., Pietras, K., Ostman, A., Heldin, C.H., Alitalo, K. and Eriksson, U. (2001) PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nat Cell Biol* 3, 512-6.
- [30] Oefner, C., D'Arcy, A., Winkler, F.K., Eggimann, B. and Hosang, M. (1992) Crystal structure of human platelet-derived growth factor BB. *Embo J* 11, 3921-6.
- [31] Fredriksson, L., Li, H. and Eriksson, U. (2004) The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev* 15, 197-204.

- [32] Liu, H., Chen, X., Focia, P.J. and He, X. (2007) Structural basis for stem cell factor-KIT signaling and activation of class III receptor tyrosine kinases. *Embo J* 26, 891-901.
- [33] Chen, X., Liu, H., Focia, P.J., Shim, A.H. and He, X. (2008) Structure of macrophage colony stimulating factor bound to FMS: diverse signaling assemblies of class III receptor tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18267-72.
- [34] Yang, Y., Yuzawa, S. and Schlessinger, J. (2008) Contacts between membrane proximal regions of the PDGF receptor ectodomain are required for receptor activation but not for receptor dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7681-6.
- [35] Yuzawa, S., Opatowsky, Y., Zhang, Z., Mandiyan, V., Lax, I. and Schlessinger, J. (2007) Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by stem cell factor. *Cell* 130, 323-34.
- [36] Kazlauskas, A. and Cooper, J.A. (1989) Autophosphorylation of the PDGF receptor in the kinase insert region regulates interactions with cell proteins. *Cell* 58, 1121-33.
- [37] Pawson, T. and Saxton, T.M. (1999) Signaling networks-do all roads lead to the same genes. *Cell* 97, 675-8.
- [38] Raines, E.W. (2004) PDGF and cardiovascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 15, 237-54.
- [39] Bonner, J.C. (2004) Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 15, 255-73.
- [40] Burkhardt, A., DiMaio, D. and Schlegel, R. (1987) Genetic and biochemical definition of the bovine papillomavirus E5 transforming protein. *Embo J* 6, 2381-5.
- [41] Burkhardt, A., Willingham, M., Gay, C., Jeang, K.T. and Schlegel, R. (1989) The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes. *Virology* 170, 334-9.
- [42] Windisch, D., Hoffmann, S., Afonin, S., Vollmer, S., Benamira, S., Langer, B., Burck, J., Muhle-Goll, C. and Ulrich, A.S. (2010) Structural role of the conserved cysteines in the dimerization of the viral transmembrane oncoprotein e5. *Biophys J* 99, 1764-72.
- [43] Oates, J., Hicks, M., Dafforn, T.R., DiMaio, D. and Dixon, A.M. (2008) In vitro dimerization of the bovine papillomavirus E5 protein transmembrane domain. *Biochemistry* 47, 8985-92.
- [44] Petti, L., Nilson, L.A. and DiMaio, D. (1991) Activation of the platelet-derived growth factor receptor by the bovine papillomavirus E5 transforming protein. *Embo J* 10, 845-55.
- [45] Petti, L. and DiMaio, D. (1994) Specific interaction between the bovine papillomavirus E5 transforming protein and the beta receptor for platelet-derived growth factor in stably transformed and acutely transfected cells. *J Virol* 68, 3582-92.
- [46] Nilson, L.A. and DiMaio, D. (1993) Platelet-derived growth factor receptor can mediate tumorigenic transformation by the bovine papillomavirus E5 protein. *Mol Cell Biol* 13, 4137-45.
- [47] Goldstein, D.J., Andresson, T., Sparkowski, J.J. and Schlegel, R. (1992) The BPV-1 E5 protein, the 16 kDa membrane pore-forming protein and the PDGF receptor exist in a complex that is dependent on hydrophobic transmembrane interactions. *Embo J* 11, 4851-9.

- [48] Cohen, B.D., Goldstein, D.J., Rutledge, L., Vass, W.C., Lowy, D.R., Schlegel, R. and Schiller, J.T. (1993) Transformation-specific interaction of the bovine papillomavirus E5 oncoprotein with the platelet-derived growth factor receptor transmembrane domain and the epidermal growth factor receptor cytoplasmic domain. *J Virol* 67, 5303-11.
- [49] Drummond-Barbosa, D.A., Vaillancourt, R.R., Kazlauskas, A. and DiMaio, D. (1995) Ligand-independent activation of the platelet-derived growth factor beta receptor: requirements for bovine papillomavirus E5-induced mitogenic signaling. *Mol Cell Biol* 15, 2570-81.
- [50] Mattoon, D., Gupta, K., Doyon, J., Loll, P.J. and DiMaio, D. (2001) Identification of the transmembrane dimer interface of the bovine papillomavirus E5 protein. *Oncogene* 20, 3824-34.
- [51] Surti, T., Klein, O., Aschheim, K., DiMaio, D. and Smith, S.O. (1998) Structural models of the bovine papillomavirus E5 protein. *Proteins* 33, 601-12.
- [52] Windisch, D., Hoffmann, S., Afonin, S., Vollmer, S., Benamira, S., Langer, B., Bürck, J., Muhle-Goll, C. and Ulrich, A.S. (2010) Structural role of the conserved cysteines in the dimerization of the viral transmembrane oncoprotein E5. *Biophys J* 99, 1764-72.
- [53] Meyer, A.N., Xu, Y.F., Webster, M.K., Smith, A.E. and Donoghue, D.J. (1994) Cellular transformation by a transmembrane peptide: structural requirements for the bovine papillomavirus E5 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4634-8.
- [54] Klein, O., Kegler-Ebo, D., Su, J., Smith, S. and DiMaio, D. (1999) The bovine papillomavirus E5 protein requires a juxtamembrane negative charge for activation of the platelet-derived growth factor beta receptor and transformation of C127 cells. *J Virol* 73, 3264-72.
- [55] Goldstein, D.J., Li, W., Wang, L.M., Heidaran, M.A., Aaronson, S., Shinn, R., Schlegel, R. and Pierce, J.H. (1994) The bovine papillomavirus type 1 E5 transforming protein specifically binds and activates the beta-type receptor for the platelet-derived growth factor but not other related tyrosine kinase-containing receptors to induce cellular transformation. *J Virol* 68, 4432-41.
- [56] Petti, L.M., Reddy, V., Smith, S.O. and DiMaio, D. (1997) Identification of amino acids in the transmembrane and juxtamembrane domains of the platelet-derived growth factor receptor required for productive interaction with the bovine papillomavirus E5 protein. *J Virol* 71, 7318-27.
- [57] Wallin, E. and von Heijne, G. (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci* 7, 1029-38.
- [58] Opella, S.J. and Marassi, F.M. (2004) Structure determination of membrane proteins by NMR spectroscopy. *Chem Rev* 104, 3587-606.
- [59] Eilers, M., Shekar, S.C., Shieh, T., Smith, S.O. and Fleming, P.J. (2000) Internal packing of helical membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5796-801.
- [60] Russ, W.P. and Engelman, D.M. (2000) The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J Mol Biol* 296, 911-9.
- [61] Lemmon, M.A., Flanagan, J.M., Hunt, J.F., Adair, B.D., Bormann, B.J., Dempsey, C.E. and Engelman, D.M. (1992) Glycophorin A dimerization is driven by specific interactions between transmembrane alpha-helices. *J Biol Chem* 267, 7683-9.

- [62] MacKenzie, K.R. and Engelman, D.M. (1998) Structure-based prediction of the stability of transmembrane helix-helix interactions: the sequence dependence of glycophorin A dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3583-90.
- [63] Javadpour, M.M., Eilers, M., Groesbeek, M. and Smith, S.O. (1999) Helix packing in polytopic membrane proteins: role of glycine in transmembrane helix association. *Biophys J* 77, 1609-18.
- [64] MacKenzie, K.R., Prestegard, J.H. and Engelman, D.M. (1997) A transmembrane helix dimer: structure and implications. *Science* 276, 131-3.
- [65] Smith, S.O., Song, D., Shekar, S., Groesbeek, M., Ziliox, M. and Aimoto, S. (2001) Structure of the transmembrane dimer interface of glycophorin A in membrane bilayers. *Biochemistry* 40, 6553-8.
- [66] Senes, A., Ubarretxena-Belandia, I. and Engelman, D.M. (2001) The Calpha --H...O hydrogen bond: a determinant of stability and specificity in transmembrane helix interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9056-61.
- [67] Walters, R.F. and DeGrado, W.F. (2006) Helix-packing motifs in membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13658-63.
- [68] Senes, A., Gerstein, M. and Engelman, D.M. (2000) Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions. *J Mol Biol* 296, 921-36.
- [69] Senes, A., Engel, D.E. and DeGrado, W.F. (2004) Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Curr Opin Struct Biol* 14, 465-79.
- [70] Fleishman, S.J., Schlessinger, J. and Ben-Tal, N. (2002) A putative molecular-activation switch in the transmembrane domain of erbB2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15937-40.
- [71] Choma, C., Gratkowski, H., Lear, J.D. and DeGrado, W.F. (2000) Asparagine-mediated self-association of a model transmembrane helix. *Nat Struct Biol* 7, 161-6.
- [72] Zhou, F.X., Cocco, M.J., Russ, W.P., Brunger, A.T. and Engelman, D.M. (2000) Interhelical hydrogen bonding drives strong interactions in membrane proteins. *Nat Struct Biol* 7, 154-60.
- [73] Bocharov, E.V., Pustovalova, Y.E., Pavlov, K.V., Volynsky, P.E., Goncharuk, M.V., Ermolyuk, Y.S., Karpunin, D.V., Schulga, A.A., Kirpichnikov, M.P., Efremov, R.G., Maslennikov, I.V. and Arseniev, A.S. (2007) Unique dimeric structure of BNip3 transmembrane domain suggests membrane permeabilization as a cell death trigger. *J Biol Chem* 282, 16256-66.
- [74] Call, M.E., Pyrdol, J. and Wucherpfennig, K.W. (2004) Stoichiometry of the T-cell receptor-CD3 complex and key intermediates assembled in the endoplasmic reticulum. *Embo J* 23, 2348-57.
- [75] Call, M.E., Pyrdol, J., Wiedmann, M. and Wucherpfennig, K.W. (2002) The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell* 111, 967-79.
- [76] Landschulz, W.H., Johnson, P.F. and McKnight, S.L. (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240, 1759-64.
- [77] Bocharov, E.V., Mayzel, M.L., Volynsky, P.E., Mineev, K.S., Tkach, E.N., Ermolyuk, Y.S., Schulga, A.A., Efremov, R.G. and Arseniev, A.S. (2010) Left-handed dimer of EphA2 transmembrane domain: Helix packing diversity among receptor tyrosine kinases. *Biophys J* 98, 881-9.

- [78] Oxenoid, K. and Chou, J.J. (2005) The structure of phospholamban pentamer reveals a channel-like architecture in membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10870-5.
- [79] Kelly, S.M., Jess, T.J. and Price, N.C. (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* 1751, 119-39.
- [80] Winter, R. and Noll, F. (1998) *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, Teubner Verlag Stuttgart.
- [81] Bulheller, B.M., Rodger, A. and Hirst, J.D. (2007) Circular and linear dichroism of proteins. *Phys Chem Chem Phys* 9, 2020-35.
- [82] Provencher, S.W. and Glockner, J. (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* 20, 33-7.
- [83] van Stokkum, I.H., Spoelder, H.J., Bloemendal, M., van Grondelle, R. and Groen, F.C. (1990) Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra. *Anal Biochem* 191, 110-8.
- [84] Sreerama, N. and Woody, R.W. (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem* 287, 252-60.
- [85] Sreerama, N., Venyaminov, S.Y. and Woody, R.W. (1999) Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein Sci* 8, 370-80.
- [86] Sreerama, N. and Woody, R.W. (1993) A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal Biochem* 209, 32-44.
- [87] Whitmore, L. and Wallace, B.A. (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* 32, W668-73.
- [88] Yang, J.T., Wu, C.S. and Martinez, H.M. (1986) Calculation of protein conformation from circular dichroism. *Methods Enzymol* 130, 208-69.
- [89] Wu, Y., Huang, H.W. and Olah, G.A. (1990) Method of oriented circular dichroism. *Biophys J* 57, 797-806.
- [90] Chen, F.Y., Lee, M.T. and Huang, H.W. (2002) Sigmoidal concentration dependence of antimicrobial peptide activities: a case study on alamethicin. *Biophys J* 82, 908-14.
- [91] Clayton, A.H. and Sawyer, W.H. (2000) Oriented circular dichroism of a class A amphipathic helix in aligned phospholipid multilayers. *Biochim Biophys Acta* 1467, 124-30.
- [92] Vogel, H. (1987) Comparison of the conformation and orientation of alamethicin and melittin in lipid membranes. *Biochemistry* 26, 4562-72.
- [93] Friebolin, F. (2006) *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie* Volume 4. Auflage), Wiley-VCH.
- [94] Lottspeich, F. and Engels, J.W. (2006) *Bioanalytik* Volume 2. Auflage), Spektrum Akademischer Verlag.
- [95] Breeze, A.L. (2000) Isotope-filtered NMR methods to study biomolecular structure and interactions. *Prog NMR Spectrosc* 36, 323-72.
- [96] Sørensen, O.W., Eich, G.W., Levitt, M.H., Bodenhausen G. and R.R., E. (1983) Product operator formalism for the description of NMR pulse experiments. *Prog Magn Reson Spectr* 16, 163-92.
- [97] Bornstein, P. and Balian, G. (1970) Cleavage at Asn-Gly Bonds with Hydroxylamine. *Methods of Enzymology* 54, 132-145.

- [98] Windisch, D. (2009) Struktur und Dimerisierung des membranständigen Onkoproteins E5 aus dem Rinder-Papillomavirus Typ I. Dissertation Universität Karlsruhe.
- [99] Sattler, M., Schleucher, J. and Griesinger, C. (1999) Heteronuclear multidimensional NMR experiments for the structure determination of proteins in solution employing pulsed field gradients. *Prog. NMR Spectrosc.* 34, 93-158.
- [100] Zwahlen, C., Legault, P., Vincent, S., Greenblatt, J., Konrat, R. and Kay, L.E. (1997) Methods for Measurement of Intermolecular NOEs by Multi-Nuclear NMR Spectroscopy: Application to an N-peptide:boxB RNA Complex. *J Am Chem Soc* 94, 6711-21.
- [101] Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G.W., Zhu, G., Pfeifer, J. and Bax, A. (1995) NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* 6, 277-93.
- [102] Johnson, B.A. (2004) Using NMRView to visualize and analyze the NMR spectra of macromolecules. *Methods Mol Biol* 278, 313-52.
- [103] Linge, J.P., O'Donoghue, S.I. and Nilges, M. (2001) Automated assignment of ambiguous nuclear overhauser effects with ARIA. *Methods Enzymol* 339, 71-90.
- [104] Laskowski, R.A., Rullmann, J.A., MacArthur, M.W., Kaptein, R. and Thornton, J.M. (1996) AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR* 8, 477-86.
- [105] Koradi, R., Billeter, M. and Wüthrich, K. (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graph* 14, 51-5, 29-32.
- [106] Levitt, M.H., Suter, D. and Ernst, R.R. (1986) Spin dynamics and thermodynamics in solid-state NMR cross polarization. *J Chem Phys* 84, 4243-4255.
- [107] Sinha, N., Grant, C.V., Wu, C.H., De Angelis, A.A., Howell, S.C. and Opella, S.J. (2005) SPINAL modulated decoupling in high field double- and triple-resonance solid-state NMR experiments on stationary samples. *J Magn Reson* 177, 197-202.
- [108] Miozzari, G.F. and Yanofsky, C. (1978) Translation of the leader region of the Escherichia coli tryptophan operon. *J Bacteriol* 133, 1457-66.
- [109] Mao, D. and Wallace, B.A. (1984) Differential light scattering and absorption flattening optical effects are minimal in the circular dichroism spectra of small unilamellar vesicles. *Biochemistry* 23, 2667-73.
- [110] Wishart, D.S., Bigam, C.G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H.J., Oldfield, E., Markley, J.L. and Sykes, B.D. (1995) ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J Biomol NMR* 6, 135-40.
- [111] Wishart, D.S. and Sykes, B.D. (1994) The ^{13}C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using ^{13}C chemical-shift data. *J Biomol NMR* 4, 171-80.
- [112] Hirokawa, T., Boon-Chieng, S. and Mitaku, S. (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 14, 378-9.
- [113] Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. and Sonnhammer, E.L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305, 567-80.

- [114] Shen, Y., Delaglio, F., Cornilescu, G. and Bax, A. (2009) TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *J Biomol NMR* 44, 213-23.
- [115] Mendrola, J.M., Berger, M.B., King, M.C. and Lemmon, M.A. (2002) The single transmembrane domains of ErbB receptors self-associate in cell membranes. *J Biol Chem* 277, 4704-12.
- [116] Artemenko, E.O., Egorova, N.S., Arseniev, A.S. and Feofanov, A.V. (2008) Transmembrane domain of EphA1 receptor forms dimers in membrane-like environment. *Biochim Biophys Acta* 1778, 2361-7.
- [117] Mineev, K.S., Bocharov, E.V., Pustovalova, Y.E., Bocharova, O.V., Chupin, V.V. and Arseniev, A.S. (2010) Spatial structure of the transmembrane domain heterodimer of ErbB1 and ErbB2 receptor tyrosine kinases. *J Mol Biol* 400, 231-43.
- [118] Bocharov, E.V., Mineev, K.S., Volynsky, P.E., Ermolyuk, Y.S., Tkach, E.N., Sobol, A.G., Chupin, V.V., Kirpichnikov, M.P., Efremov, R.G. and Arseniev, A.S. (2008) Spatial structure of the dimeric transmembrane domain of the growth factor receptor ErbB2 presumably corresponding to the receptor active state. *J Biol Chem* 283, 6950-6.
- [119] Bocharov, E.V., Mayzel, M.L., Volynsky, P.E., Goncharuk, M.V., Ermolyuk, Y.S., Schulga, A.A., Artemenko, E.O., Efremov, R.G. and Arseniev, A.S. (2008) Spatial structure and pH-dependent conformational diversity of dimeric transmembrane domain of the receptor tyrosine kinase EphA1. *J Biol Chem* 283, 29385-95.
- [120] Walkenhorst, W.F., Merzlyakov, M., Hristova, K. and Wimley, W.C. (2009) Polar residues in transmembrane helices can decrease electrophoretic mobility in polyacrylamide gels without causing helix dimerization. *Biochim Biophys Acta* 1788, 1321-31.
- [121] Hu, J., Asbury, T., Achuthan, S., Li, C., Bertram, R., Quine, J.R., Fu, R. and Cross, T.A. (2007) Backbone structure of the amantadine-blocked transmembrane domain M2 proton channel from Influenza A virus. *Biophys J* 92, 4335-43.
- [122] Schnell, J.R. and Chou, J.J. (2008) Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. *Nature* 451, 591-5.
- [123] Nishimura, K., Kim, S., Zhang, L. and Cross, T.A. (2002) The closed state of a H⁺ channel helical bundle combining precise orientational and distance restraints from solid state NMR. *Biochemistry* 41, 13170-7.
- [124] Mathai, J.C., Tristram-Nagle, S., Nagle, J.F. and Zeidel, M.L. (2008) Structural determinants of water permeability through the lipid membrane. *J Gen Physiol* 131, 69-76.
- [125] Xu, Q., Kim, M., Ho, K.W., Lachowicz, P., Fanucci, G.E. and Cafiso, D.S. (2008) Membrane hydrocarbon thickness modulates the dynamics of a membrane transport protein. *Biophys J* 95, 2849-58.
- [126] Strandberg, E., Esteban-Martin, S., Salgado, J. and Ulrich, A.S. (2009) Orientation and dynamics of peptides in membranes calculated from 2H-NMR data. *Biophys J* 96, 3223-32.
- [127] Kim, T. and Im, W. (2010) Revisiting hydrophobic mismatch with free energy simulation studies of transmembrane helix tilt and rotation. *Biophys J* 99, 175-83.

- [128] Liu, J., Oh, P., Horner, T., Rogers, R.A. and Schnitzer, J.E. (1997) Organized endothelial cell surface signal transduction in caveolae distinct from glycosylphosphatidylinositol-anchored protein microdomains. *J Biol Chem* 272, 7211-22.
- [129] Lingwood, D. and Simons, K. (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 327, 46-50.
- [130] Pike, L.J. (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res* 44, 655-67.

10. Anhang

Tabelle 10.1: Mehrdeutige intermolekulare NOE-Kontakte des PDGFR- β -TM Dimers, die dem Programm ARIA-CNS zur Strukturberechnung vorgegeben wurden. Der Abstand der Protonen liegt zwischen 1,5 und 6,5 Å. Zur Unterscheidung zwischen den beiden identischen Helices des Dimers sind die Aminosäuren des einen Moleküls mit einem Strich (') gekennzeichnet.

Mehrdeutige intermolekulare NOE-Kontakte			
- V501' H γ_1 / V501 H γ_2 oder V501' H γ_2 / V501 H γ_1	- V511' H γ_1 / L512 H α oder V511' H γ_2 / L512 H α	- L512 H δ_1 / I514' H β oder L512 H δ_2 / I514' H β	- I514' H γ_2 / I514 H γ_1 oder I514' H γ_2 / I519 H γ_1 oder I519' H γ_2 / I514 H γ_1 oder I519' H γ_2 / I519 H γ_1 oder I514' H γ_2 / L512 H γ
- V501 H γ_1 / V501' H γ_2 oder V501 H γ_2 / V501' H γ_1	- V511 H γ_1 / L512' H α oder V511 H γ_2 / L512' H α	- L512 H δ_1 / I514' H α oder L512 H δ_2 / I514' H α	- I514' H γ_2 / I514 H α oder I519' H γ_2 / I519 H α
- V501' H γ_1 / V501 H α oder V501' H γ_2 / V501 H α	- L512' H δ_1 / I514 H γ_2 oder L512' H δ_1 / I514 H δ_1 oder L512 H δ_1 / L512' H δ_2	- L512 H δ_1 / L512' H α oder L512 H δ_2 / L512' H α	- I514 H δ_1 / I514' H δ_1 oder I514 H δ_1 / I514' H γ_2
- V501 H γ_1 / V501' H α oder V501 H γ_2 / V501' H α	- L512' H δ_1 / L512 H γ oder L512' H δ_2 / L512 H γ oder L512' H δ_2 / I514 H γ_{11} oder L512' H δ_2 / I514 H γ_{12}	- L512 H δ_1 / I514' H δ_1 oder L512 H δ_2 / I514' H γ_2	- I519 H δ_1 / I519' H δ_1 oder I519 H δ_1 / I519' H γ_2
- A508' H β / L512 H γ oder A508' H β / L509 H γ	- L512' H δ_1 / I514 H β oder L512' H δ_2 / I514 H β	- A505' H δ_1 / I514 H δ_1 oder A505' H δ_1 / I514 H γ_2	- I514 H δ_1 / I514' H γ_1 oder I514 H δ_1 / I519' H γ_1 oder I519 H δ_1 / I514' H γ_1 oder I519 H δ_1 / I519' H γ_1 oder I514 H δ_1 / L512' H γ
- A508 H β / L512' H γ oder A508 H β / L509' H γ_1	- L512' H δ_1 / I514 H α oder L512' H δ_2 / I514 H α	- I519' H δ_1 / I519 H δ_1 oder I519' H δ_1 / I519 H γ_2	- I514 H δ_1 / I514' H α oder I519 H δ_1 / I519' H α
- A508 H β / L512' H δ_1 oder A508 H β / L512' H δ_2	- L512' H δ_1 / L512 H α oder L512' H δ_2 / L512 H α	- I514' H δ_1 / I514 H γ_1 oder I514' H δ_1 / I519 H γ_1 oder I519' H δ_1 / I514 H γ_1 oder I514' H δ_1 / L512 H γ	- I514 H γ_2 / I514' H δ_1 oder I514 H γ_2 / I514' H γ_2
- A508' H β / L512 H δ_1 oder A508' H β / L512 H δ_2	- L512' H δ_1 / I514 H δ_1 oder L512' H δ_2 / I514 H δ_2	- I514' H δ_1 / I514 H α oder I519' H δ_1 / I519 H α	- I519 H γ_2 / I519' H δ_1 oder I519 H γ_2 / I519' H γ_2
- V511' H γ_1 / L512 H δ_1 oder V511' H γ_1 / L512 H δ_2 oder V511' H γ_2 / L512 H δ_1 oder V511' H γ_2 / L512 H δ_2	- L512 H δ_1 / I514' H γ_2 oder L512 H δ_1 / I514' H δ_1	- I514' H γ_2 / I514 H δ_1 oder I514' H γ_2 / I514 H γ_2	- I514 H γ_2 / I514' H γ_1 oder I514 H γ_2 / I519' H γ_1 oder I519 H γ_2 / I514' H γ_1 oder I519 H γ_2 / I519' H γ_1 oder I514 H γ_2 / L512' H γ
- V511 H γ_1 / L512' H δ_1 oder V511 H γ_1 / L512' H δ_2 oder V511 H γ_2 / L512' H δ_1 oder V511 H γ_2 / L512' H δ_2	- L512 H δ_1 / L512' H γ oder L512 H δ_2 / L512' H γ oder L512 H δ_2 / I514' H γ_{11} oder L512 H δ_2 / I514' H γ_{12}	- I519' H γ_2 / I519 H δ_1 oder I519' H γ_2 / I519 H γ_2	- I514 H γ_2 / I514' H α oder I519 H γ_2 / I519' H α

Tabelle 10.2: Eindeutige intermolekulare NOE-Kontakte des PDGFR- β -TM Dimers, die dem Programm ARIA-CNS zur Strukturberechnung vorgegeben wurden. Der Abstand der Protonen liegt zwischen 2,0 und 4,5 Å. Zur Unterscheidung zwischen den beiden identischen Helices des Dimers sind die Aminosäuren des einen Moleküls mit einem Strich (') gekennzeichnet.

Eindeutige intermolekulare NOE-Kontakte
- V501 H γ_2 / V501' H γ_1
- V501 H γ_2 / V501' H γ_2
- M522' H ϵ / I519 H δ_1
- M522 H ϵ / I519' H δ_1
- A505' H β / V501 H α
- A505 H β / V501' H α

Publikationen

Fachartikel

- (1) „*Structural role of the conserved cysteines in the dimerization of the viral transmembrane oncoprotein E5*“

Windisch, D., Hoffmann, S., Afonin, S., Vollmer, S., Benamira, S., Langer, B., Bürck, J., Muhle-Goll, C. and Ulrich, A.S., (2010) Biophys J 99, 1764-72.

- (2) „*The transmembrane helix of PDGF receptor β forms a left-handed coiled-coil dimer and adjusts its tilt angle in response to the bilayer thickness*“

Muhle-Goll, C. *, Hoffmann, S. *, Windisch, D., Bürck, J., Afonin, S. and Ulrich, A.S., (2010), in Vorbereitung

*Beide Autoren tragen gleichermaßen zu dieser Arbeit bei.

Tagungsbeiträge

Poster:

- (1) „*Role of the Transmembrane Helix of Platelet-derived Growth Factor β Receptor*“

Hoffmann, S., Windisch, D., Muhle-Goll, C., Bürck, J., Afonin, S., Grage, S. and Ulrich, A.S.

Signal Transduction and Disease: Trination Fall Meeting 2009 of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology of Belgium, Germany and the Netherlands, Aachen, Deutschland, 2009

- (2) „*Influence of the conserved cysteines on the membrane structure of the bovine papillomavirus E5 oncoprotein*“

Windisch, D., Hoffmann, S., Muhle-Goll, C., Bürck, J., Vollmer, S., Afonin, S. and Ulrich, A.S.

Signal Transduction and Disease: Trination Fall Meeting 2009 of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology of Belgium, Germany and the Netherlands, Aachen, Deutschland, 2009

- (3) „*Conformation and alignment analysis of the viral oncoprotein E5 and the PDGF- β receptor transmembrane domain by CD and oriented CD spectroscopy*“

Bürck, J., Windisch, D., Hoffmann, S., Afonin, S., Langer, B., Muhle-Goll, C. and Ulrich, A.S.

12th International Conference on Circular Dichroism (CD 2009) and 5th Interdisciplinary Symposium on Biological Chirality (ISBC), Brescia, Italien, 2009

- (4) „*Structural characterization of the transmembrane helix of the platelet-derived growth factor receptor- β* “

Hoffmann, S., Windisch, D., Muhle-Goll, C., Bürck, J., Afonin, S., Grage, S. and Ulrich, A.S.

455th WE-Heraeus-Seminar: Biophysics of Membrane-Active Peptides,
Bad Honnef, Deutschland, 2010

- (5) „*Structural features of the transmembrane E5 oncoprotein from bovine papillomavirus*“

Windisch, D., Hoffmann, S., Muhle-Goll, C., Bürck, J., Afonin, S. and Ulrich, A.S.

455th WE-Heraeus-Seminar: Biophysics of Membrane-Active Peptides,
Bad Honnef, Deutschland, 2010

Kurzvortrag:

- (1) „*Structural characterization of the transmembrane helix of the platelet-derived growth factor receptor- β* “

Hoffmann, S.

455th WE-Heraeus-Seminar: Biophysics of Membrane-Active Peptides,
Bad Honnef, Deutschland, 2010

Lebenslauf

Silke Hoffmann

Geburtsdatum: 19.04.1983
Geburtsort: Bretten

Schul Ausbildung

1989 – 1993	Grundschule Bretten-Büchig
1993 – 1999	Schillerschule Bretten
1999 – 2002	Käthe-Kollwitz-Schule Bruchsal
Juni 2002	Abitur

Hochschulausbildung

Oktober 2002 – August 2007	Chemiestudium an der Universität Karlsruhe (TH), Abschluss im August 2007 zur Diplom-Chemikerin
März 2007 – August 2007	Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl Biochemie der Universität Karlsruhe (TH) bei Prof. Dr. Anne S. Ulrich Thema: „Rolle der Disulfidbrücken bei der Dimerisierung des viralen Onkoproteins E5“
seit November 2007	Promotionsstudium am Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl Biochemie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich bei Prof. Dr. Anne S. Ulrich Thema: „Die Rolle des Transmembran-segments bei der Dimerisierung des PDGF-Rezeptors β “

Berufliche Praxis

seit November 2007	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Organische Chemie, Lehrstuhl Biochemie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich
--------------------	---